

# *Lactococcus lactis subsp. lactis* IL1403 谷氨酸脱羧酶的克隆表达、 分离纯化及活性研究

张天萌, 沐万孟, 江波\*, 张涛, 倪靓霞

(食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 谷氨酸脱羧酶(GAD)是功能因子 $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)生物合成过程中的重要酶。为了得到一种有高效活性的GAD基因工程菌,克隆到一种GAD基因,来源于微生物*Lactococcus lactis subsp. lactis* IL1403。以pET-22b(+)为载体质粒,*Escherichia coli* BL21(DE3)为宿主细胞,构建了基因重组菌,IPTG可诱导目的重组GAD过量表达;经亲和层析纯化的重组蛋白质样品进行SDS-PAGE分析,在约54 000处出现显著的特征蛋白质条带;活性检测结果表明,该重组GAD的转化活性比野生菌株有明显提高,野生菌株经5 h细胞转化,反应底物转化率为55.8%,而工程菌20 min后转化率达到82.1%,30 min后转化可达到98.3%。

**关键词:** 谷氨酸脱羧酶; $\gamma$ -氨基丁酸;克隆表达;亲和层析;细胞转化

中图分类号: Q 78 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2012)03-0302-05

## Cloning, Expression, Purification and Characterization of Glutamate Decarboxylase from *Lactococcus lactis subsp. lactis* IL1403

ZHANG Tian-meng, MU Wan-meng, JIANG Bo\*, ZHANG Tao, NI Liang-xia

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** Glutamate decarboxylase(GAD) is the main enzyme for biotransformation glutamate to gamma-Aminobutyric acid (GABA), a functional factor. In order to obtain a genetically engineered bacteria with high activity of GAD, a gene encoding glutamate decarboxylase from *Lactococcus lactis subsp. lactis* IL1403 was cloned and over-expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). The bacterium was induced by IPTG and analyzed by SDS-PAGE. The recombinant glutamate decarboxylase was purified to electrophoretic homogeneity by affinity chromatography. Approximately 54 kDa exogenous proteins were observed on the SDS-PAGE. The activity of recombinant GAD was also studied, the bioconversion rate reached 98.2% after 30 minutes, which was a significant improvement when compared with that of the wild type strain.

**Key words:** glutamate decarboxylase, gamma-Aminobutyric acid, cloning and expression, affinity chromatography, cell conversion

收稿日期: 2011-01-13

基金项目: 江苏省社会发展科技支撑项目(BE2010678; BE2010626)。

\*通信作者: 江波(1962-),男,江苏无锡人,工学博士,教授,博士研究生导师,主要从事食品化学及应用酶技术方面的研究。

E-mail:bjjiang@jiangnan.edu.cn

$\gamma$ -氨基丁酸 (Gamma-aminobutyric acid, GABA) 是一种天然存在的非蛋白组成氨基酸,在哺乳动物体内 GABA 是一种抑制性神经递质,介导 40% 以上的抑制性神经信号<sup>[1]</sup>。GABA 具有提高脑活力<sup>[2]</sup>、降低血压<sup>[3]</sup>,安定精神<sup>[4]</sup>、改善肝肾机能等功能,因而它在功能食品中具有广泛的应用前景。

谷氨酸脱羧酶 (Glutamate decarboxylase, GAD) 是一种磷酸吡哆醛 (PLP) 类酶,是 GABA 生物合成过程中的重要酶<sup>[5]</sup>。GAD 广泛存在于单细胞有机体、植物组织到高级哺乳动物体内,但在细胞中的存在量甚微。细菌 GAD 中研究最多最深入的是 *E. coli* GAD<sup>[6-7]</sup>,另外在乳酸菌<sup>[8-11]</sup>等微生物中也有很多报道。

作者以 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403 GAD 基因组为模板,通过设计引物、PCR 扩增获得 GAD 的编码基因,连接至 PMD 19-T simple vector 进行亚克隆,以 pET22b(+) 为载体,构建获得重组质粒 pET22b-ll-gad,并在大肠杆菌中实现成功表达,同野生菌种相比,表达产物 GAD 的生物活性有了显著的提高,具备了工业应用的潜质。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 菌株与载体** *E. coli* DH5 $\alpha$ 、*E. coli* BL21 (DE3): 购于上海生工公司; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403: 来自法国国家农艺研究院 (INRA); 克隆载体 PMD 19-T simple vector: 购于宝生物工程(大连)有限公司; 表达载体 pET-22b(+): 中国科学技术大学生命科学学院王玉珍教授惠赠。

**1.1.2 工具酶和试剂** DNA polymerase、胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒: 上海生工公司; T4 DNA 连接酶、Wide Range DNA Marker (500~12 000)、蛋白质标样、限制性内切酶 *Nde* I、*Xho* I 及 PCR 产物纯化试剂盒: 宝生物工程(大连)有限公司; Chelating Sepharose Fast Flow: GE 公司;  $\gamma$ -氨基丁酸: Sigma 公司; 其它均为国产分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403 GAD 基因的 PCR 扩增** 依据 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403 GAD 基因序列设计引物,为

方便其构建重组质粒、定向克隆,于上下游引物 5' 端分别引入 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点。引物序列如下:

引物 1: 5'-GCCATATGTTATACGGAAAA GAAAATCGCG-3'

引物 2: 5'-CATGCTCGAGGTGAGTAAAT CCATGTGTTT-3'

以 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403 菌液 DNA 为模板,PCR 扩增 GAD 基因。PCR 条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 57.9 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1.5 min, 进行 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保藏。

**1.2.2 PCR 产物的亚克隆、鉴定** 用胶回收试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒纯化 PCR 产物,然后将纯化产物连接至 PMD19-T simple Vector,再将连接产物转化至 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中,涂布于蓝白斑筛选平板,37 °C 培养过夜,选取白色菌落初步确定为阳性菌落。挑取白色单菌落至 LB 液体培养基(含 50  $\mu$ g/mL 氨苄抗生素)中,37 °C、200 r/min 培养过夜,通过菌液 PCR 扩增目的基因、对抽提质粒进行酶切分析检测,得到阳性克隆,送上海生工测序。将鉴定为阳性克隆的重组质粒命名为 T-ll-gad。

**1.2.3 工程菌的重组构建** 将阳性重组质粒 T-ll-gad 及质粒 pET-22b(+) 分别用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切,回收目的片段后,以 T4 DNA 连接酶进行连接,连接产物转化至 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中。通过筛选与鉴定,获得重组质粒阳性克隆,重组质粒命名为 pET22b-ll-gad,重组工程菌命名为 *E. coli* BL21(pET22b-ll-gad)。

**1.2.4 工程菌的诱导表达** 将重组菌 *E. coli* BL21(pET22b-ll-gad) 接种于 4 mL LB 液体培养基(含 50  $\mu$ g/mL 氨苄抗生素)中,37 °C 下 200 r/min 培养过夜; 将其接种至 200 mL LB 培养基中,37 °C、200 r/min 培养至 OD 值为 0.6~0.8,加入终浓度为 1 mmol/L 的异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG),30 °C 条件下 200 r/min 诱导培养 5 h。每隔 1 h 取菌液进行 SDS-PAGE 电泳分析。

**1.2.5 SDS-PAGE 电泳分析** 取诱导后的菌液 40  $\mu$ L,加入 10  $\mu$ L 5  $\times$  SDS 样品缓冲液,混匀后于沸水中加热 5 min,12 000 r/min 离心 3 min,取 15  $\mu$ L 上清液进行浓缩胶质量浓度为 4 g/dL,分离胶浓度

为 12 g/dL 的 SDS-PAGE 电泳分析。

**1.2.6 重组 GAD 的纯化** 离心收集菌体, 以 Binding Buffer (50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, 500 mmol/L NaCl, pH 7.5) 重悬菌体, 超声波破碎细胞 (250 W, 超声 1 s, 停顿 2 s, 全程工作时间 5 min) 后, 离心 (10 000 r/min, 20 min, 4 °C), 收集上清液进行亲和层析纯化。采用 Ni<sup>2+</sup>-Chelating Sepharose Fast Flow 亲和介质填充层析柱, 对重组蛋白进行纯化。上柱前预先以 3 倍柱体积的 Binding Buffer 平衡亲和柱, 样品上柱后以 Wash buffer (50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, 500 mmol/L NaCl, 50 mmol/L 咪唑, pH 7.5) 洗脱杂蛋白质, 再用 Elution buffer (50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, 500 mmol/L NaCl, 500 mmol/L 咪唑, pH 7.5) 洗脱重组蛋白质, 最终用 Sample buffer (50 mmol/L 醋酸盐缓冲液, pH 4.8) 对洗脱蛋白质进行透析 (以上操作均在 4 °C 条件下进行)。对每个步骤取样进行 SDS-PAGE 分析。

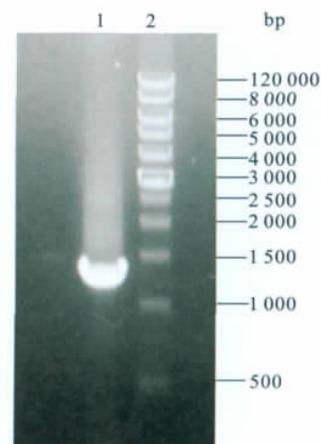
**1.2.7 重组 GAD 生物活性测定** GAD 催化谷氨酸钠生成 GABA, 细胞转化反应体系为: 50 mL 菌液离心所得菌体, 25 mmol/L 谷氨酸钠, 用 pH 4.8<sup>[12-13]</sup>、50 mmol/L 醋酸盐缓冲液定容至 10 mL, 反应温度为 45 °C。底物与产物含量可通过 HPLC 进行测定。方法为: 向待测体系中加入等体积 10% 的三氯乙酸 (TCA), 振荡均匀<sup>[14]</sup>, 再离心 (2 000 g, 5 min), 清液稀释 2~10 倍, 再经 0.45 μm 膜过滤, HPLC 分析。HPLC 采用 ODS C18 (φ4.6 mm × 250 mm), 40 °C 分析, GABA 用外标法定量。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Lactococcus lactis subsp. lactis* IL1403 GAD 基因的 PCR 扩增、克隆及鉴定

以 *Lactococcus lactis subsp. lactis* IL1403 GAD 菌液 DNA 为模板, 扩增出了一条约 1.4 kb 的条带, 与预期的扩增产物大小吻合, 见图 1。

使用 T4 DNA 连接酶将纯化后的 *Lactococcus lactis subsp. lactis* IL1403 GAD 基因连接到 PMD 19-T 载体, 转化培养, 经菌液 PCR 鉴定、提质粒检测质粒大小, 得到阳性重组质粒 T-ll-gad, 送上海生工测序, 测序结果与 NCBI (登录号: NC\_002662) 中已知基因完全吻合。



1: PCR 扩增片段; 2: 标准 DNA

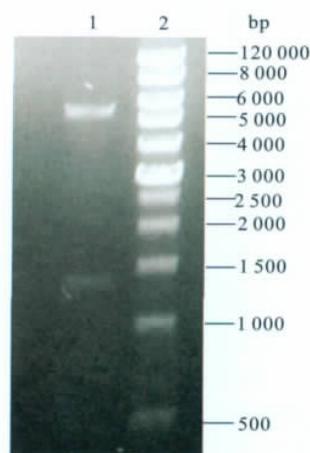
图 1 GAD 基因的 PCR 扩增片段检测

Fig. 1 Analysis of GAD amplified by PCR

### 2.2 重组表达质粒 pET22b-ll-gad 的构建

将重组质粒 T-ll-gad 与表达载体 pET-22b(+) 分别使用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切, 用 T4 DNA 连接酶进行连接。

将重组表达质粒 pET22b-ll-gad 经 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切, 得到 pET-22b(+) 线性片段和插入的目的基因片段, 该片段与 PCR 产物大小相同, pET22b-ll-gad 双酶切鉴定结果见图 2。



1: pET22b-ll-gad 酶切片段/ *Nde* I+*Xho* I; 2: 标准 DNA

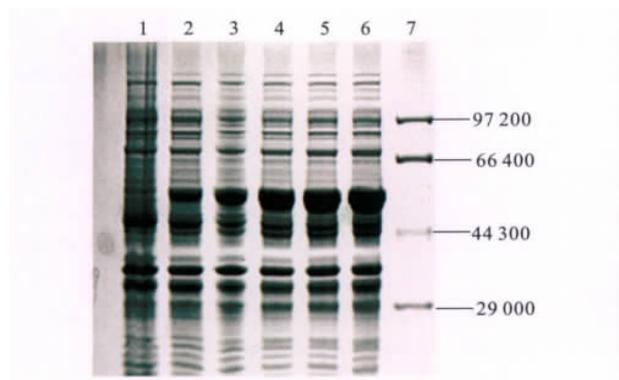
图 2 重组质粒 pET22b-ll-gad 的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction enzymatic analysis of recombinant plasmid pET22b-ll-gad

### 2.3 工程菌的诱导表达及重组 GAD 的纯化

对重组菌 *E. coli* BL21(pET22b-ll-gad) 的诱导表达进行了初步研究, 表达产物 SDS-PAGE 分析结

果见图 3。重组菌株经诱导表达后,约在 54 000 处明显出现特征蛋白质条带。随着 1 mmol /L 的 IPTG 诱导时间加长,目的蛋白表达量梯度增加。5 h 后,GAD 表达量达到细胞总蛋白质的一半以上,基本达到最高诱导量。

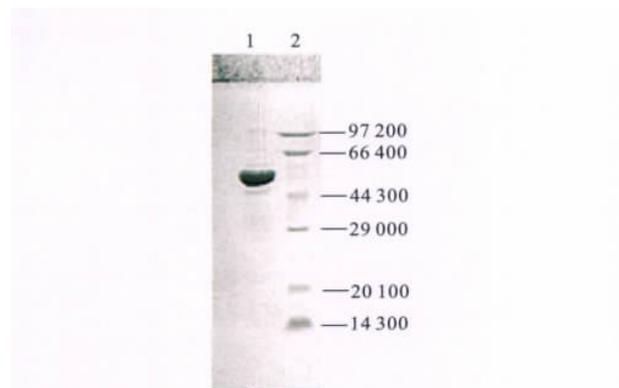


1: *E. coli* BL21(pET22b-ll-gad) 诱导前全细胞片段; 2~6: *E. coli* BL21(pET22b-ll-gad) 经 IPTG 诱导 1~5 h 全细胞片段; 7: 标准相对分子质量蛋白质

图 3 重组 GAD 在 *E. coli* BL21 中的表达

Fig. 3 Recombinant GAD expression in *E. coli* BL21

Ni<sup>2+</sup>-Chelating Sepharose Fast Flow 亲和层析后进行 SDS-PAGE 分析结果见图 4。表明蛋白质较纯,大小与预期相符。



1: 亲和层析纯化后的重组蛋白质; 2: 标准相对分子质量蛋白质

图 4 纯化后的重组 GAD 的分析

Fig. 4 Analysis of recombinant GAD purified

### 2.4 工程菌重组 GAD 的细胞转化活性

对工程菌进行细胞转化实验,结果见图 5。*E. coli* BL21 经过 5 h 细胞转化后底物转化率仅为 2.8%,GAD 活性很低;野生菌 5 h 反应后转化率为 55.7%;相比之下,工程菌仅反应 0.5 h 后转化率已到达 98.3%。这说明工程菌重组基因 GAD 得到了

正确表达,并且细胞转化能力有了显著的提高。

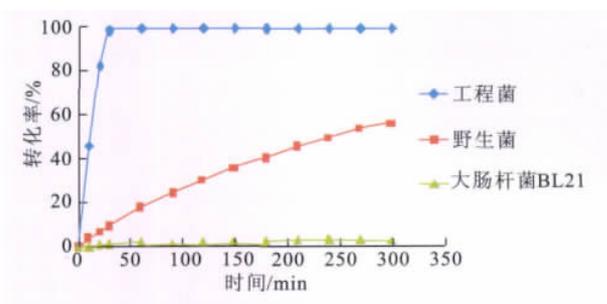


图 5 细胞转化进程曲线

Fig. 5 Process curve of cell conversion

## 3 结 语

GABA 是一种具有多种功能性质的食品因子,已经在饮料等产品中得到了应用,其优良的功能性质受到了人们的广泛关注。GAD 是生物转化生产 GABA 工程中的关键酶,对其进行大量的开发及活性提高研究具有广泛的应用前景。

作者以 *Lactococcus lactis subsp. lactis* IL1403 GAD 基因为模板,通过菌液 PCR 及基因克隆技术,将目的基因构建到 pET-22b(+) 为载体中,获得重组质粒 pET22b-ll-gad,并将该质粒转化至 *E. coli* BL21(DE3) 中获得工程菌。用 1 mmol/L IPTG 诱导该工程菌重组基因的过量表达。经亲和层析纯化的重组蛋白质样品进行 SDS-PAGE 电泳分析,约在 54 000 处出现特征蛋白条带,证明了 *Lactococcus lactis subsp. lactis* IL1403 GAD 基因在 *E. coli* BL21 中的到了正确的表达。通过细胞转化实验比较了工程菌、野生菌、及 *E. coli* BL21(DE3) 对底物的细胞转化能力。工程菌在 25 mmol/L 谷氨酸钠、pH 4.8、45 °C 的反应体系里反应 0.5 h 底物转化率可达 98.3%,实验结果表明,工程菌的 GABA 生产能力有了显著提高。其进一步的工业生产有着广阔的前景。

据文献[12,13]报道,微生物来源的 GAD 在偏酸(4~5)的环境有较高的活性,而在中性或碱性下活性很低,下一步我们将对 *Lactococcus lactis subsp. lactis* IL1403 GAD 催化机制进行研究,并试着通过改变其分子结构提高其 pH 值适应性,提高酶活。

## 参考文献(References):

- [1] Horie H, Rechnitz G A. Enzymatic flow injection determination of gamma-aminobutyric acid[J]. **Analytical letters**, 1995, 28(2):259-266.
- [2] Leventhal A G, Wang Y, Pu M, et al. GABA and its agonists improved visual cortical function in senescent monkey[J]. **Science**, 2003, 300(6520): 812-815.
- [3] Kazami D, Ogura N, Fukushi T, et al. Antihypertensive effect of Japanese taste seasoning containing  $\gamma$ -aminobutyric acid on mildly hypertensive and high-normal blood pressure subjects and normal subjects[J]. **Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi**, 2002, 49(6): 409-415.
- [4] Emrich H M, Zerssen D V, Ksling W, et al. Effect of sodium valproate on mania: the GABA-hypothesis of affective disorders[J]. **Arch Psychiatr Nerve**, 1980, 299(1): 1-16.
- [5] Sardana R K, Awad R, Arnason J T, et al. Expression of recombinant goldfish glutamic acid decarboxylase 65 and evidence for differential pH and PLP responsiveness compared to the human enzyme[J]. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, 2006, 144(1): 94-100.
- [6] Maras B, Sweeney G, Barra D, et al. The amino acid sequence of glutamate decarboxylase from *Escherichia coli*, Evolutionary relationship between mammalian and bacterial enzymes[J]. **European Journal of Biochemistry**, 1992, 204(1):93-98.
- [7] Smith D K, Kassam T, Singh B, et al. *Escherichia coli* has two homologous glutamate decarboxylase genes that map to distinct loci[J]. **Journal of Bacteriology**, 1992, 174(18):5820-5826.
- [8] Ueno Y, Hayakawa K, Takahashi S, et al. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* IFO12005[J]. **Biosci Biotechn Biochem**, 1997, 61(7):1168-1171.
- [9] Nomura M, Nakajima I, Fujita Y. *Lactococcus lactis* contains only one glutamate decarboxylase gene[J]. **Microbiology**, 1999, 145(6): 1375-1380.
- [10] Bolotin A, Wincker P, Mauger S, et al. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403[J]. **Genome Res**, 2001, 11(5): 731-753.
- [11] 刘婷婷, 杨套伟, 张术聪, 等. 高效转化 L-谷氨酸为  $\gamma$ -氨基丁酸菌株的筛选、鉴定及初步优化[J]. **食品与生物技术学报**, 2010, 29(5):742-747.  
LIU Ting-ting, YANG Tao-wei, ZHANG Shu-cong, et al. Screening, identification and primary optimizing of strain producing  $\gamma$ -aminobutyric acid from L-glutamic acid[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2010, 29(5):742-747. (in Chinese)
- [12] Hao R, Schmit J C. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Neurospora crassa conidia*[J]. **Biol Chem**, 1991, 266(8): 5135-5139.
- [13] Ueno Y, Hayakawa K, Takahashi S, et al. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* IFO 12005[J]. **Biosci Biotech Biochem**, 1997, 61(7):1168-1171.
- [14] Takayo S, Toshiroh H, Yutata M. Distribution of free amino acids in the rice kernel and kernel fractions and the effect of water soaking in the distribution [J]. **Agric Food Chem**, 1994, 42(5):1122-1125.