

Streptomyces hygroscopicus 谷氨酰胺转胺酶原基因的 鉴定及在大肠杆菌中的表达

任增亮^{1,2}, 张东旭^{1,2}, 俞梅英², 赵庆新^{1,2}, 堵国成^{2,3}, 陈坚^{1,2}, 吴敬^{1,2*}

(江南大学¹食品科学与技术国家重点实验室,²生物工程学院,³工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122)

摘要:【目的】鉴定来源于吸水链霉菌的谷氨酰胺转胺酶基因; 研究其在大肠杆菌系统的克隆与表达; 分析该酶与其同源酶的活性中心氨基酸序列。【方法】从本实验室筛选的吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*; CCTCC M203062)发酵液中, 分离纯化得到谷氨酰胺转胺酶原(pro-MTGase), 测得 N-端前十个氨基酸序列并与其它链霉菌来源的相应基因序列比较设计引物, 扩增得到 pro-MTGase 基因, 将该基因插入到表达载体 pET-20b(+)信号肽 pelB 下游, 构建分泌型表达载体 pET/pro-MTG, 并转化不同的大肠杆菌宿主 BL21(DE3)和 Rosetta(DE3)pLysS。【结果】获得了 pro-MTGase 的完整基因序列, 多重碱基序列比对表明其与 *S. platensis* 和 *S. caniferus* 的 pro-MTGase 基因同源性高达 92%。利用 Rosetta(DE3)pLysS 通过降温至 24℃ 诱导策略, 获得部分胞外表达的酶原。SDS-PAGE 显示, 胞外表达重组蛋白的分子量约为 44kDa, 与吸水链霉菌表达的天然酶原相符。诱导 4 h 后发酵液中的重组酶原经胰蛋白酶活化为成熟酶后测得最高酶活为 0.24U/mL。【结论】该研究是对吸水链霉菌的谷氨酰胺转胺酶基因的首次报道, 也是国内首次利用大肠杆菌实现 pro-MTGase 的胞外可溶性表达。

关键词: 吸水链霉菌; 谷氨酰胺转胺酶; 大肠杆菌; 克隆; 表达

中图分类号: R78,Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 04-0480-06

谷氨酰胺转胺酶 (Transglutaminase, TGase, EC2.3.2.13) 是一种通过形成异肽键[ϵ -(γ -谷氨酰)赖氨酸]来催化蛋白质或多肽链之间的酰基转移反应的转移酶^[1], 其广泛存在于各种真核生物和原核生物中。在真核生物体内, TGase 参与一些重要的生理活动, 如血液凝固, 细胞分化等^[2,3], 但真核来源的 TGase 依赖 Ca^{2+} 的激活且生产成本较高, 从而限制其广泛应用, 而来源于原核生物的 TGase (简称 MTGase), 其活性发挥不需要 Ca^{2+} 参与^[4], 在食品工业、化妆品工业和生物制药等领域具有非常广阔的应用前景^[5]。

自 1989 年 Ando 等^[4]报道链霉菌等能分泌 MTGase, 至今已有大量关于链霉菌及其它菌种发酵产酶的研究。对链霉菌产酶机理研究发现, 谷氨酰胺

转胺酶是以 pre-pro-MTGase 的形式表达, 信号肽 pre-region 引导 pro-MTGase 分泌到胞外, pro-region 能够促使成熟 MTGase 正确折叠^[6]。pro-MTGase 三维结构显示其 N-端 pro-region 覆盖在成熟酶活性中心部位外面, 阻碍底物的靠近, 导致酶原没有催化活性^[7]。pro-MTGase 在链霉菌自身分泌的蛋白酶作用下切除 pro-region 而成为有活性的成熟酶^[8], 在胞外也可以利用胰蛋白酶或中性蛋白酶来达到这种活化效果^[6]。由于利用链霉菌发酵产酶量较低, 生产成本高, 所以构建基因工程菌获得高产菌种是实现高产量高效益的一个最有潜力的途径。目前, 国外的研究大多是研究不同生物来源的 TGase 的性质、结构和功能以及基因水平的改造和基因工程表达^[9,10]。至今,

基金项目: 国家自然科学基金(3077055); 江苏省高技术研究计划(BG2007009); 国家杰出青年科学基金(20625619)

*通讯作者。Tel/ Fax: +86-510-85327802; E-mail: jingwu@jiangnan.edu.cn

作者简介: 任增亮(1983-), 男, 山东日照人, 硕士研究生, 主要从事发酵工程研究。E-mail: rzl_1983@hotmail.com

收稿日期: 2007-08-30; 修回日期: 2008-01-03

在 *E. coli* 中高效可溶性表达 MTGase 的研究都没有取得理想效果, 如 Takehana 等利用 ompA 信号肽可以使 MTGase 转运至周质空间但表达量很低^[11]; Christian K 等^[12]利用大肠杆菌表达茂原链霉菌的 pro-MTGase, 结果只获得部分胞内表达。国内的相关研究^[13,14]都是在大肠杆菌中表达谷氨酰胺转氨酶成熟酶的基因, 结果都形成包涵体, 必须通过复性才能测得酶活。

由于 MTGase 具有蛋白交联作用, 以活性形式表达可能不利于宿主菌生长; 另外, pro-region 对成熟酶的折叠有重要作用^[6], 所以本研究从吸水链霉菌中得到谷氨酰胺转氨酶的酶原基因, 插入到表达载体 pET-20b(+) 带有的信号肽 pelB 下游, 利用表达稀有密码子及易于胞外表达的宿主 Rosetta(DE3)pLysS 通过降温诱导策略, 获得了胞外可溶性表达的酶原, 利用胰蛋白酶(trypsin)切除 pro-region 获得有活性的成熟酶。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 吸水链霉菌(*Streptomyces hygrosopicus*) CCTCC M203062, 大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109、BL21(DE3)、Rosetta(DE3)pLysS 本实验室保藏; 克隆质粒 pMD18-T simple vector, 购自 TaKaRa 公司; 表达质粒 pET-20b(+), 购自 Novagen 公司。

1.1.2 主要试剂和仪器: 质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购自上海生工生物工程公司; 限制性内切酶 *Nco*、*Bam*H、T4 DNA 连接酶、*Pyrobest* DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司; CBZ-Gln-Gly 和 L-谷氨酸- γ -单羟胺酸购自 Sigma 公司; 其他所用试剂均为分析纯。PCR 仪、蛋白电泳仪、UVP 凝胶成像系统均购自美国 BIO-RAD 公司; 北京六一 DYY-6C 型电泳仪; 美国 SONIC MATERIALS 超声波破碎仪; 蛋白纯化系统购自上海沪西分析仪器有限公司。

1.1.3 培养基: ① 吸水链霉菌培养基: 同文献^[15]; ② LB, TB, SOB, SOC 培养基: 细菌常规通用培养基; ③ 自动诱导培养基: LB 培养基中添加 0.45g/L 葡萄糖, 1.2g/L 乳糖, 4.5g/L 甘油, 22.5mmol/L KH_2PO_4 , 17.3 mmol/L Na_2HPO_4 , 1.8mmol/L MgSO_4 , 参照 Studier^[16]。重组大肠杆菌培养基中添加终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氯苄青霉素。

1.2 酶活测定

酶活测定方法参照参考文献^[17]进行。

1.3 酶原 pro-MTGase 的分离纯化

S. hygrosopicus 36 h 的发酵液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻离心, 上清液加入终浓度为 70%(V/V) 的乙醇, 得到沉淀蛋白迅速溶解在 50mmol/L pH 5.0 醋酸钠缓冲液(buffer A)中, 然后以 1mL/min 流速通过阳离子交换柱(25mL Fractogel EMD SO_3^- column, Merck, Darmstadt, Germany), 利用含有 0~1 mol/L NaCl 的 buffer A 梯度洗脱。pro-MTGase 在 NaCl 浓度为 0.25~0.35 mol/L 之间洗脱下来。纯化到的酶原经胰蛋白酶处理后测定酶活进行确认。

1.4 酶原 N-端氨基酸测序及基因碱基测序

纯化的酶原样品经 SDS-PAGE、转膜、染色后进行 N-端氨基酸测序。氨基酸测序由上海基康生物技术公司完成; 碱基序列测定由上海生工生物技术公司完成。

1.5 pro-MTGase 基因 PCR 扩增

1.5.1 DNA 提取: 吸水链霉菌总 DNA 的提取按照萨姆布鲁克分子实验操作手册^[18] 改进操作。为提高破壁效率, 添加溶菌酶(终浓度 5mg/mL) 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1h 破壁, 然后添加蛋白酶 K(终浓度 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和 SDS(终浓度 0.5%), 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30min, 其它操作同手册。

1.5.2 PCR 扩增: 根据吸水链霉菌天然酶原 N-端前十氨基酸测序结果及平板链霉菌, 肉桂链霉菌, 弗氏链霉菌的 pro-MTGase 的碱基序列比较设计引物如下: Primer1: 5'-GTTTACATCATATGACCATGGCTAGC-GGTGACGACGA-3'; Primer2: 5'-GATTATGAATTCG GATCC TTACGGCCAGCCCTGCTTT-3。下划线部分分别为 *Nco* 和 *Bam*H 限制酶切位点。PCR 反应采用 50 μL 体系, 反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。最后加入 rTaq 0.5 μL 尾部加 A, 72 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min。

1.6 质粒载体构建

克隆载体的构建: PCR 产物经胶回收试剂盒回收纯化后与 pMD18-T 载体 16 连接过夜。连接产物热击法转化 JM109 感受态细胞, 蓝白斑筛选出阳性克隆子, 接种至 LB/Amp 过夜培养, 质粒用 *Nco* 与 *Bam*H 双酶切验证, 得到克隆载体 pMD/pro-MTG。

表达载体的构建: pMD/pro-MTG 和 pET-20b(+) 通过 *Nco* 与 *Bam*H 双酶切后回收目的片段, 16

连接过夜后转化 JM109, 涂布 LB/Amp 平板筛选, 抽提质粒并通过碱基测序验证, 最终得到表达载体 pET/pro-MTG 转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 和 Rosetta(DE3) pLysS, 获得重组菌 BL21/pET-MTG 和 Rosetta/pET-MTG。

1.7 诱导表达

重组菌接种至 10mL LB/Amp 液体培养基中 37 培养过夜, 1.5mL 发酵液接种至 50mL Amp 抗性培养基中, 37 200 r/min 生长至 $OD_{600}=1.0\sim 1.5$ 时, 添加终浓度为 $400\mu\text{mol/L}$ IPTG 继续在 37 或降温到 24 后进行诱导培养 4h。

1.8 超声破碎

为准确的对比各样品的表达量, $5OD_{600}$ 细胞量作为标准。每个样品所用发酵液体积 $V_{\text{sample}}=5/OD_{600}$ 。0.5mL Tris-HCl(pH 8.0)重悬菌体, 冰浴超声破壁, 功率 400W, 持续 30s 后停止 30s, 反复 10 个循环。

1.9 重组酶原的活化

0.5mL 破壁离心上清液中加入胰蛋白酶至终浓度为 500U/mL , 37 温育 10min。

1.10 SDS-PAGE

聚丙烯酰胺凝胶采用碧云天蛋白电泳试剂制备。样品处理参照文献[12]。

2 结果

2.1 天然吸水链霉菌 pro-MTGase 的纯化及 N-端氨基酸测序

利用 *S. hygroscopicus* 的 36h 发酵液经乙醇沉淀和阳离子交换色谱纯化得到电泳纯的谷氨酰胺转氨酶酶原, 纯化电泳图和层析色谱曲线如图 1。

纯化得到的酶原经胰蛋白酶处理后酶活曲线如图 2。由图中可见, *S. hygroscopicus* 谷氨酰胺转氨酶酶原可以被胰蛋白酶活化。在实验条件下, 处理 10min 可将约相当于 1.5U/mL 的酶原完全转化为成熟酶。时间延长可能会导致胰蛋白酶的非特异性切割。

经过酶原 N-端前 10 个氨基酸测序, 得到氨基酸序列为: ASGDDEEREG, 与其它链霉菌来源的 pro-MTGase 的 N-端氨基酸序列具有较高的同源性(表 1)。

2.2 吸水链霉菌 pro-MTGase 基因的克隆

通过 NCBI 基因库获得平板链霉菌(*S. platensis*, AY555726.1), 肉桂链霉菌(*S. cinamomeus*, AB085698.1), 弗氏链霉菌(*S. fradiae*, DQ432028.1)的谷氨酰胺转氨酶完整基因序列。通过分析这 3 种来源的 pro-MTGase 末端序列的保守性, *S. hygroscopicus* 天然酶原 N-端测序

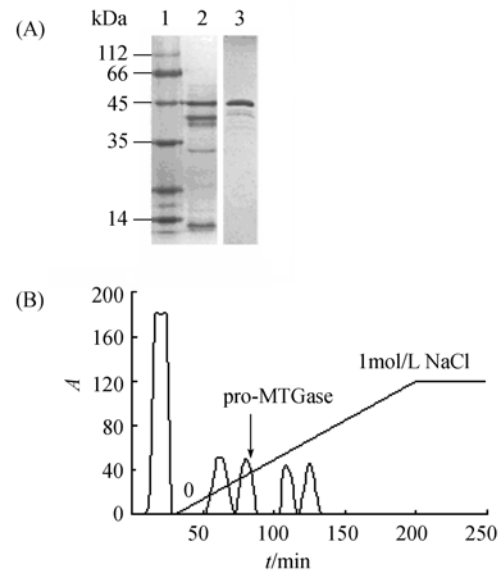


图 1 谷氨酰胺转氨酶酶原的纯化

Fig. 1 Purification process of wild-type pro-MTGase. A: SDS-PAGE; B: curve of chromatogram. 1.Marker; 2.Liquid culture of *S. hygroscopicus*; 3.Purified pro-MTGase.

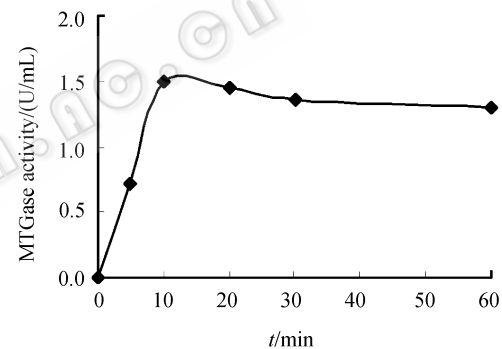


图 2 pro-MTGase 经胰蛋白酶活化曲线

Fig. 2 Curve of active pro-MTGase with trypsin.

表 1 pro-MTGase N-端氨基酸序列多重比对
Table 1 Multiple alignment of pro-MTGase N-terminal amino acid sequence

Organism	N-terminal sequence	Accession NO.
<i>S. hygroscopicus</i>	ASGDDEEREG	This work
<i>S. platensis</i>	ASGGDGEWEG	CAN88986
<i>S. fradiae</i>	ADSGDGAKKG	ABE03877
<i>S. cinamomeus</i>	ASSGDGEEKG	BAC24766
	* . . . * :*	

“*”single, fully conserved residue; “:” conservation of strong groups; “.”conservation of weak groups.

结果以及文献报道^[7], 以保持扩增得到的碱基序列所编码氨基酸与天然酶原一致和高引物特异性为目的, 设计引物, 以 *S. hygroscopicus* 总 DNA 为模板, PCR 扩增得到目的片段, 电泳显示约 1.2kb, 符合预测大小。利用 pMD-18T 载体通过 TA 克隆, 转化大肠肝

菌 JM109, 获得带有完整 pro-MTGase 基因的克隆质粒 pMD/pro-MTG。

2.3 吸水链霉菌 pro-MTGase 基因序列的测定和分析
 碱基测序结果表明 pro-MTGase 基因共 1170bp, 编码 389 个氨基酸, 其 N-端前十个氨基酸为 ASGDD-EEREG, 与天然酶原 N-端测定结果完全一致。引物设计只涉及前六个氨基酸, 后面 4 个氨基酸是通过扩增的碱基序列翻译后而得到的, 有力证明了克隆得到吸水链霉菌的 pro-MTGase 基因的完整性和准确性。根据有关链霉菌属来源的 MTGase 的报道^[19]预测

<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	61	SYGCVGVTVW	251	WVNFYDYGWFG	AQTEADADKT	IWTHANHYHA
<i>Streptomyces platensis</i>	61	SYGCVGVTVW	251	WVNFYDYGWFG	AQAEADADKT	VWTHANHYHA
<i>Streptomyces fradiae</i>	61	SYGCVGVTVW	251	WVNFYDYGWFG	AQTAADADKT	TWTHGDHYHA
<i>Streptomyces cinnamomeus</i>	61	SYGCVGVTVW	251	WVNFYDYGWFG	AQTEADADKT	TWTHGDHYHA
		*****		*****	*****	*****

图 3 几种链霉菌来源的谷氨酰胺转氨酶特征性氨基酸序列比对

Fig. 3 Multiple alignment of partial amino acid sequence of pro-MTGase from *Streptomyces* species.

2.4 表达载体 pET/pro-MTG 的构建

由于 MTGase 是一种胞外酶, 为构建分泌型表达载体, 将 pro-MTGase 基因插入到表达载体 pET-20b(+)
 的信号肽 pelB 下游, 如图 4 所示过程构建得到表达载体命名为 pET/pro-MTG。

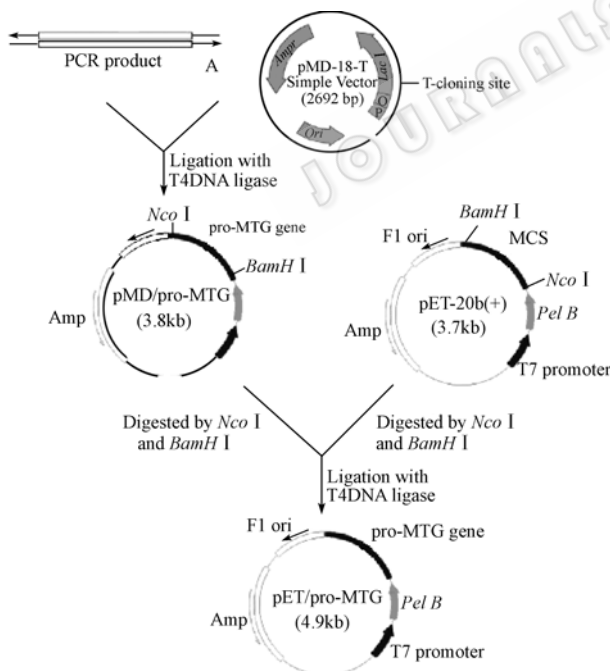


图 4 重组表达载体 pET/pro-MTG 的构建

Fig. 4 Construction of recombinant plasmid pET/pro-MTG.

2.5 重组蛋白的诱导表达

对 BL21/pET-MTG 研究了 37 恒温诱导和低温

S. hygroscopicus 谷氨酰胺转氨酶的成熟酶由 331 个氨基酸组成, pro-region 由 58 个氨基酸组成, 多重序列比对表明 MTGase 催化三联体“Cys64-His274-Asp255”在吸水链霉菌酶中也完全保守(图 3), 特别是活性中心部位 SYGCVG(Cys⁶⁴附近)序列具有高度保守性。

S. hygroscopicus 编码 pro-MTGase 的基因含有大量大肠杆菌稀有密码子如 AGA、AGG、CGG、GGA、GGG 等, 其中 AGA、CGG 和 AGG 占编码精氨酸密码子中的 53.6%(15/28); GGA、GGG 占编码甘氨酸密码子中 38.7%(12/31)。

24 诱导。两种诱导策略的结果一致, 在诱导 4h 后重组蛋白大量表达, 皆在胞内形成包涵体, 胞外无可溶性的酶原, 表明降温诱导和信号肽 pelB 均没有有效发挥作用。作者又尝试不同诱导及表达策略, 如不同诱导剂浓度、28 恒温培养及诱导、采用自动诱导培养基、培养基中添加甘氨酸、精氨酸等方法, 结果均未得到可溶性表达。

由于 BL21/pET-MTG 没有获得可溶性表达, 所以尝试采用表达稀有密码子和便于胞外分泌表达的宿主 Rosetta(DE3)pLysS。重组大肠杆菌 Rosetta/pET-MTG 于 37 培养至 $OD_{600}=1.5$, 然后降温 24 采用 0.4mmol/L IPTG 诱导 4h。蛋白电泳结果如图 5。经过理论计算得出带有 pelB 信号肽的 pelB-pro-MTGase 分子量为 46.0kDa, 酶原 pro-MTGase 分子量为 43.8kDa, 成熟酶 MTGase 分子量为 37.6kDa。由图可以看出, 诱导 1 h 后在 46.0kDa 处出现明显的目的蛋白的包涵体条带(Lane 8), 诱导 4 h 后在 46.0kDa 处出现较粗的包涵体蛋白条带(Lane 7); 细胞破壁后的离心上清液(Lane 4,5)经胰蛋白酶处理后没有检测到酶活, 说明没有可溶性 pelB-pro-MTGase 部分存在; 在诱导 4h 后的发酵上清液中出现约 43.8kDa 的蛋白条带(Lane 1), 经胰蛋白酶处理后酶活达到 0.24U/mL, 说明有少量酶原获得胞外可溶性分泌表达。经 SDS-PAGE 凝胶成像扫描分析胞外可溶性酶原蛋白占总胞外表达蛋白量的 17.6%。

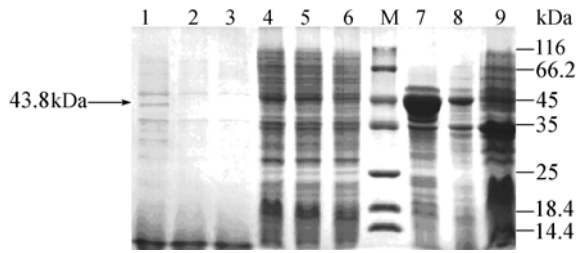


图5 Rosetta/pET-MTG 诱导表达重组蛋白电泳图

Fig. 5 SDS-PAGE of samples from induced Rosetta/pET-MTG. Lane 1,2 and 3: culture supernatant after inducing 4h, 1h and 0h; Lane 4,5 and 6: cellular soluble fraction after inducing 4h, 1h and 0h; Lane 7,8 and 9: cellular insoluble fraction after inducing 4h, 1h and 0h; M: protein molecular weight markers.

3 讨论

采用本实验室自行筛选到的吸水链霉菌 (*Streptomyces hygroscopicus*; CCTCC M203062) 发酵液, 通过乙醇沉淀和 Fractogel EMD SO_3^- 柱有效分离纯化得到天然酶原 pro-MTGase, 利用 N-端氨基酸测序结果以及与其他 3 种链霉菌来源的谷氨酰胺转氨酶基因比对, 设计引物完整准确的获得吸水链霉菌的 pro-MTGase 基因。虽然碱基序列在引物部分可能与原始基因稍有差别, 但是氨基酸序列完全一致, 该方法比构建基因文库法方便省时。通过碱基序列分析来源于 *S. hygroscopicus* 的 pro-MTGase 基因与 *S. caniferus* (AM746294.1), *S. platensis* (AY555726.1; AM746296.1), *S. paucisporogenes* (AM746295.1) 的酶的同源性均为 92%。通过氨基酸序列分析: 该酶与来源于 *S. paucisporogenes*, *S. caniferus* 的酶的同源性为 91%, 与来源于 *S. platensis* 的酶的同源性为 90%。此外, 多重序列分析结果表明, 链霉菌来源的 MTGase 活性中心结构具有高度保守性。本研究是首次报道吸水链霉菌来源的 pro-MTGase 基因。

利用大肠杆菌表达重组谷氨酰胺转氨酶已经有大量研究, 大部分的研究直接克隆表达成熟的 MTGase, 大都形成包涵体, 没有得到可溶性的胞外表达, 必须经过复性操作才能获得酶活。本研究利用大肠杆菌宿主 BL21(DE3) 表达的目的蛋白大部分依然以包涵体形式存在, 没有得到胞外可溶性表达, 而利用 Rosetta(DE3)pLysS 宿主获得了少量的胞外表达, 可能是该宿主表达 T7 溶菌酶使细胞的通透性增强, 从而有利于目的蛋白的胞外分泌。虽然本研究实现了 MTGase 的胞外表达, 但由于获得的酶活较低, 离工业化生产还有一定差距。表达量的进一步提高可以尝试在 *E. coli* 中采用表达融合蛋白、分子伴侣以改善目

的蛋白的折叠, 防止包涵体的形成; 另一方面可以更换适合于胞外分泌表达的枯草芽孢杆菌表达系统来提高可溶性表达量。

MTGase 在食品工业、化妆品工业和生物制药等领域具有非常广阔的应用前景, 现在通过大肠杆菌系统已获得可溶性胞外表达, 但还需要进一步提高表达效率, 为低成本高产量工业化的实现奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Zhu Y, Rinzema A, Tramper J, *et al.* Microbial transglutaminase-a review of its production and application in food processing. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995, 44: 277-282.
- [2] Greenberg CS, Birckbichler PJ, Rice RH. Transglutaminase :multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *FASEB J*, 1991, 5: 3071-3077.
- [3] Friedrich P, Aszodi A. Calcium-dependent proteolysis and isopeptide bond formation: calpains and transglutaminases. *Pure Appl Chem*, 1992, 64: 1093-1097.
- [4] Ando H, Adachi M, Umeda K, *et al.* Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agric Biol Chem*, 1989, 53: 2613-2617.
- [5] Yokoyama K, Nio N, Kikuchi Y. Properties and applications of microbial transglutaminase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 64: 447-454.
- [6] Pasternack R, Dorsch S, Otterbach JT, *et al.* Bacterial pro- transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*: purification, characterization and sequence of the zymogen. *Eur J Biochem*, 1998, 257: 570-576.
- [7] Kashiwagi T, Yokoyama K, Ishikawa K, *et al.* Crystal Structure of Microbial Transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*. *J Biol Chem*, 2002, 277: 44252-60.
- [8] Zotzel J, Keller P, Fuchsbaauer HL. Transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* is activated by an endogenous metalloprotease. *Eur J Biochem*, 2003, 270: 3214-3222.
- [9] Date M, Yokoyama K, Umezawa Y, *et al.* High level expression of *Streptomyces mobaraensis* transglutaminase in *Corynebacterium glutamicum* using a chimeric pro-region from *Streptomyces cinnamomeus* transglutaminase. *Journal of Biotechnology*, 2004, 110: 219-226.
- [10] Kawai M, Takehana S, Takagi H. High-level expression of the chemically synthesized gene for microbial transglutaminase from *Streptovorticillium* in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1997, 61(5): 830-835.
- [11] Takehana S, Washizu K, Ando K, *et al.* Chemical synthesis of the gene for microbial transglutaminase from *Streptovorticillium*

- and its expression in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1994, 58: 88–92.
- [12] Christian KM, Thomas CH, Markus P. Soluble expression of a pro-transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* in *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40(6): 1543–1550.
- [13] 王莉, 常忠义, 李平作. 转谷氨酰胺酶基因在大肠杆菌中的克隆表达. 中国生物工程杂志(*China Biotechnology*), 2004, 24(11): 56–60.
- [14] 徐斌, 韩之波, 杨萍, 等. 茂原链轮丝菌转谷氨酰胺酶基因在大肠杆菌中高效表达. 生物工程学报(*Chinese Journal of Biotechnology*), 2005, 21: 794–798.
- [15] 程力, 张东旭, 堵国成, 等. 添加 CTAB 促进吸水链霉菌产谷氨酰胺转氨酶. 生物工程学报(*Chinese Journal of Biotechnology*), 2007, 23: 497–501.
- [16] Studier FW. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Exp Purif*, 2005, 41: 207–234.
- [17] Folk JE, Cole PW. Transglutaminase: mechanistic features of the active site as determined by kinetic and inhibitor studies. *Biochim Biophys Acta*, 1966, 122: 244–264.
- [18] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [19] Pasternack R, Dorsch S, Otterbach JT, et al. Bacterial pro-transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense* Purification, characterisation and sequence of the zymogen. *Eur J Biochem*, 1998, 257: 570–576.

Identification of the gene encoding transglutaminase zymogen from *Streptomyces hygroscopicus* and its expression in *Escherichia coli*

Zengliang Ren^{1,2}, Dongxu Zhang^{1,2}, Meiying Yu², Qingxin Zhao^{1,2},
Guocheng Du^{2,3}, Jian Chen^{1,2}, Jing Wu^{1,2*}

¹State Key Laboratory of Food Science and Technology, ²School of Biotechnology,

³Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Wuxi 214122, China)

Abstract: [Objective] We identified a microbial transglutaminase (MTGase) gene from *Streptomyces hygroscopicus*; cloned and expressed it in *Escherichia coli*. We also analyzed the active sites sequence of *S. hygroscopicus* MTGase through homologous sequence comparison. [Methods] Wild-type microbial transglutaminase zymogen (pro-MTGase) was purified from liquid culture of *S. hygroscopicus* (CCTCC M203062). N-terminal amino acid sequence of this pro-MTGase was determined. According to the N-terminal sequence and the corresponding nucleotide sequence of MTGase from other three *Streptomyces* species, PCR primers of *S. hygroscopicus* pro-MTGase were designed and the completed gene of pro-MTGase was amplified and sequenced. The gene was sub-cloned into pET-20b(+) vector downstream pelB signal peptide to construct the expression vector pET/pro-MTG. [Results] The nucleotide sequence showed 92 % homologue with that of *S. platensis* and *S. caniferus*. Rosetta(DE3)pLysS carrying the expression vector was induced with IPTG at 24 and expressed pro-MTGase as extracellular soluble protein. SDS-PAGE showed the expressed recombinant pro-MTGase was about 44 kDa, similar to the wild-type pro-MTGase purified from *S. hygroscopicus*. Recombinant pro-MTGase was activated with trypsin and the enzyme activity reached to 0.24U/mL. [Conclusion] This is the first report of the gene encoding microbial pro-transglutaminase from *S. hygroscopicus*, and also this is the first report of expression extracellular soluble pro-MTGase in *E. coli* in our country.

Keywords: *Streptomyces hygroscopicus*; microbial transglutaminase; *E. coli*; cloning; expression

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30770055), the Jiangsu High-Tech Project(BG2007009) and the National Science Fund for Distinguished Young Scholars(20625619)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85327802; E-mail: jingwu@jiangnan.edu.cn

Received: 30 August 2007/ Revised: 3 January 2008