

茂源链霉菌 MTG 基因 pMA5 载体的构建及鉴定

陆姣姣¹, 朱婧², 穆冬冬¹, 姜绍通¹, 郑志^{1*}

(1. 合肥工业大学食品与生物工程学院, 安徽合肥 230009; 2. 安徽农业大学理学院, 安徽合肥 230061)

摘要 [目的]提高 MTG 产量并实现简便有效的纯化过程, 以枯草芽孢杆菌为宿主构建 pMA5_{mtg} 重组质粒。[方法]通过提取茂源链霉菌的基因组 DNA, 扩增 *mtg* 基因片段, 再将异源信号肽与 *mtg* 基因片段进行融合, 融合片段和 pMA5 质粒双酶切后连接, 转化到大肠杆菌感受态细胞中, 菌落 PCR 和测序获得阳性单克隆。然后将 pMA5_{mtg} 重组质粒转入枯草芽孢杆菌感受态中, 通过抗性筛选和双酶切鉴定获取重组菌株。[结果]成功扩增出 *mtg* 基因片段, 构建出重组质粒 pMA5_{mtg}。[结论]获得 pMA5_{mtg} 重组表达菌株, 为 MTG 的纯化及其未来生物工程的改造提供了有效的方法。

关键词 MTG; 信号肽; 载体; 枯草芽孢杆菌

中图分类号 S188; Q785 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)13-0092-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.13.030

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Construction and Identification of pMA5 Vector of *Streptovercillium mobaraensis* MTG Gene

LU Jiao-jiao¹, ZHU Jing², MU Dong-dong¹ et al (1. School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei, Anhui 230009; 2. School of Science, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230061)

Abstract [Objective] In order to increase the MTG yield and achieve a simple and effective purification process, the recombinant vector pMA5_{mtg} was constructed and expressed in *Bacillus subtilis*. [Method] The *mtg* gene fragment was amplified from the genomic DNA of *Streptovercillium mobaraensis*, and the heterologous signal peptide was fused in front of the *mtg* gene fragment. The fusion fragment and the pMA5 vector were digested and ligated, and then transformed into *E. coli* competent cells. The positive strains were identified by PCR and extracted to check by DNA sequencing. The recombinant vector pMA5_{mtg} was then transformed into the competent cells of *B. subtilis*, then the recombinant strain was obtained by resistance screening and double restriction enzyme digestion. [Result] The *mtg* gene fragment was successfully amplified, and the recombinant vector pMA5_{mtg} was constructed. [Conclusion] The recombinant expression strain of pMA5_{mtg} was obtained, which provided an effective method for the purification of MTG and its future bioengineering transformation.

Key words MTG; Signal peptide; Vector; *Bacillus subtilis*

微生物来源的谷氨酰胺转氨酶(MTG)可催化蛋白质间发生交联, 经其交联的产品稳定性高, 对蛋白酶降解和化学损害具有很高的抵抗力, 因此, 它们被广泛应用于食品、纺织、材料工程等各个领域^[1-3]。但 MTG 生产成本较高, 纯化过程复杂, 限制了 MTG 的应用与发展^[4-5]。

土壤微生物枯草芽孢杆菌是食品安全级菌株, 具有高效的转录翻译系统, 分泌蛋白能力强^[6]。笔者运用分子生物学技术构建基因工程菌, 扩增 *mtg* 基因, 与载体 pMA5 连接, 转入枯草芽孢杆菌中, 获得 MTG 重组表达载体, 以进一步研究 MTG 在革兰氏阳性菌中的表达及纯化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料。茂源链霉菌(*Streptovercillium mobaraensis*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)均购自中国微生物菌种保藏中心, 再由合肥工业大学分子生物学实验室培养保存。载体构建所用质粒 pMA5, 大肠杆菌 DH5 α 。

1.1.2 主要试剂。EasyPure Bacteria Genomic DNA Kit (TransGen), EasyPure Plasmid MiniPrep Kit (TransGen), EasyPure PCR Purification Kit (TransGen), EasyPure Quick Gel Extraction Kit (TransGen), T₄-DNA Ligase (TransGen), Enzyme *Nde*I, *Nhe*I (TransGen), Taq DNA Polymerase (Sangon Biotech),

FastPfu DNA Polymerase (TransGen), DNA Marker, Tryptone, Yeast extract, NaCl, Agar, Ampicillin, Kanamycin 等。

1.2 方法

1.2.1 大肠杆菌 DH5 α 感受态的制备。取 1 mL 过夜培养的菌液, 转接入 100 mL 新鲜 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养至 OD₆₀₀ 为 0.5~0.8, 将培养液在冰上放置 30 min, 5 000 r/min、10 min、4 °C 离心收集菌体; 用 100 mL 冷水重悬菌体, 6 000 r/min、20 min、4 °C 离心去上清, 如此漂洗 3 次; 2 mL 10% 甘油重悬菌体, 7 000 r/min、10 min、4 °C 离心去上清; 最后用 0.5 mL 10% 甘油重悬菌体, 然后将其分装在 1.5 mL EP 管中, 每管 50 μ L, -80 °C 保存备用。

1.2.2 枯草芽孢杆菌感受态的制备。接种枯草芽孢杆菌于 3 mL LB 培养基中, 过夜培养。取 2.6 mL 过夜培养物接入 40 mL (LB+0.5 mol/L 山梨醇) 中, 37 °C、200 r/min 培养至 OD₆₀₀ 为 0.85~0.95, 将菌液冰水浴 10 min, 然后 5 000 r/min、5 min、4 °C 离心收集菌体。用 50 mL 预冷的电转培养基 (0.5 mol/L 山梨醇, 0.5 mol/L 甘露醇, 10% 葡萄糖) 重新吹悬菌体, 5 000 r/min、5 min、4 °C 离心去上清, 如此漂洗 4 次。将洗涤后的菌体吹悬于 1 mL 电转培养基中, 分装在 1.5 mL EP 管中, 每管 50 μ L, -80 °C 保存备用。

1.2.3 质粒和基因组 DNA 的提取。使用质粒 DNA 提取试剂盒和细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (TransGen) 分别进行质粒和基因组 DNA 提取, 操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.2.4 *mtg* 重组表达载体 pMA5_{mtg} 的构建。利用 Clonemanager 软件设计引物, 所用引物均在表 1 中列出。以 *B. subtilis*

基金项目 安徽省自然科学基金项目 (1708085QC65)。

作者简介 陆姣姣 (1993—), 女, 安徽亳州人, 硕士研究生, 研究方向: 分子生物学。* 通信作者, 教授, 博士生导师, 从事植物蛋白加工技术研究。

收稿日期 2019-03-11

168 基因组 DNA 为模板,用引物 p1 和 p2 扩增 SP_{wapA} 信号肽基因片段,将 *Nde*I 位点添加到引物 p1 的 5' 末端。以 *S. mobaraensis* 基因组 DNA 为模板,通过引物 p3 和 p4 扩增 *mtg* 片段,将 *Nhe*I 位点添加到引物 p4 的 5' 末端。引物 p2 和 p3 的 5' 末端反向互补配对。再以 SP_{wapA} 和 *mtg* 扩增子的混合物作为模板,用引物 p1 和 p4 通过融合 PCR 扩增片段 SP_{wapA}-*mtg*。将质粒 pMA5 与融合片段 SP_{wapA}-*mtg* 分别进行 *Nde*I 和 *Nhe*I 双酶切反应,酶切产物切胶回收,连接转化至 *E. coli* DH5α 中,菌落 PCR 筛选阳性克隆,再将重组质粒提取进行测序。将测序正确的重组质粒转入枯草芽孢杆菌中。

表 1 试验所用引物
Table 1 Primers used in this study

基因 Gene	引物 Primer	序列(5'—3') Sequence(5'—3')
SP _{wapA}	p1	GGAATTCCATATGAAAAAAGAAAGAG-GCGA
	p2	CTCTTCCCCCGCGCCATTGTCTGCTAGTACATCGGCTGGCAC
<i>mtg</i>	p3	GTGCCAGCCGATGTACTAGCAGACAATG-GCGCGGGGAAGAG
	p4	GCGGCCGCTAGCTCAGTGATGGTGATG-GTGATGCGGCCAGCCCTGCTTTACCTTG

1.2.5 大肠杆菌的电转化。取出-80℃冰箱存储的大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,置于冰上解冻。解冻后,吸取 2 μL 质粒或连接产物加入到感受态细胞中,混匀,吸取至已预冷的 0.2 cm 电击杯中,200 Ω、2.5 kV 进行电击,电击后迅速加入 1 mL 无菌未加抗性的 LB 液体培养基,放在 37℃ 摇床中低速振荡培养 1.5 h。待菌液混浊后,涂布于 LB+氨苄霉素的平板上。平板倒置放于 37℃ 培养箱中培养过夜。

从平板上挑取单菌落,进行菌落 PCR 鉴定,鉴定正确的阳性克隆接种于 LB+氨苄霉素的液体培养基中,培养过夜,提取质粒送去公司测序。

1.2.6 枯草芽孢杆菌的电转化。取出存储于冰箱中的枯草芽孢杆菌感受态细胞,解冻。取 2 μL 质粒加入到感受态细胞中,混匀,吸取至已预冷的 0.2 cm 电击杯中,200 Ω、2.5 kV 进行电击,电击后迅速加入 1 mL 无菌未加抗性的 RM 培养基(LB+0.5 mol/L 山梨醇+0.38 mol/L 甘露醇),37℃ 摇床培养 1.5 h 至混浊。涂布于 LB+卡那霉素的平板上,37℃ 培养过夜。

从平板上挑取单菌落,接种于 LB+卡那霉素的液体培养基中,培养过夜,提取质粒,进行 *Nde*I 和 *Nhe*I 双酶切验证,所切条带与理论大小一致时,再将质粒送去测序,最终获得阳性重组菌株。

2 结果与分析

2.1 SP_{wapA} 信号肽的扩增 为了保证 *mtg* 基因在枯草芽孢杆菌中进行分泌表达,需要信号肽指导其分泌。以 *B. subtilis* 168 基因组 DNA 为模板,扩增 SP_{wapA} 信号肽基因片段。电泳结果如图 1 所示,SP_{wapA} 长度 130 bp,与 PCR 所得片段大小一致。

2.2 *S. mobaraensis* *mtg* 的扩增 以 *S. mobaraensis* 基因组 DNA 为模板,扩增 *mtg* 基因片段。电泳结果如图 2 所示,*mtg*

长度 1 200 bp,与 PCR 所得片段大小一致。

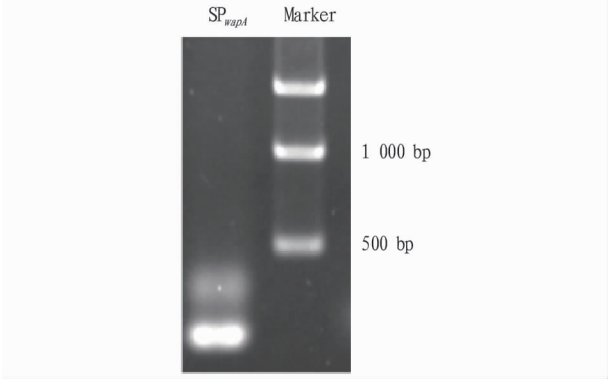


图 1 SP_{wapA} 信号肽的扩增

Fig. 1 Amplification of SP_{wapA} signal peptide

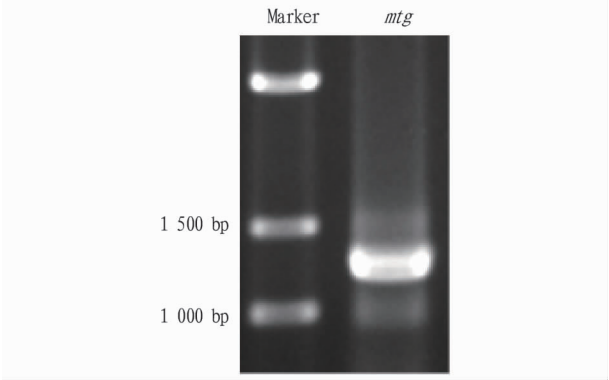


图 2 *mtg* 的扩增

Fig. 2 Amplification of *mtg*

2.3 SP_{wapA} 与 *mtg* 的融合 以 SP_{wapA} 和 *mtg* 扩增子混合物作为模板,用引物 p1 和 p4 通过融合 PCR 扩增片段 SP_{wapA}-*mtg*。SP_{wapA} 片段长度为 130 bp,*mtg* 片段长度为 1 200 bp,故融合片段 SP_{wapA}-*mtg* 长度应为 1 330 bp。电泳结果见图 3,融合片段 1 330 bp 比片段 *mtg* 略长,与 PCR 所得片段大小一致。

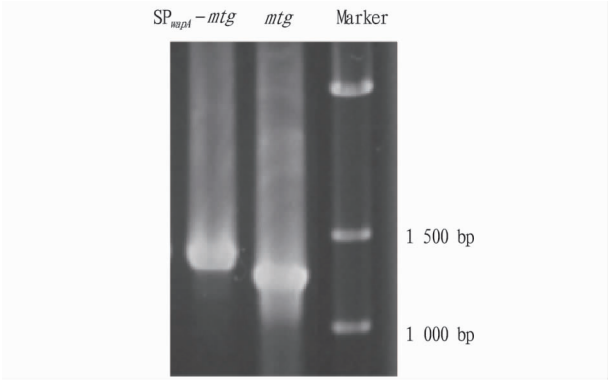


图 3 SP_{wapA} 与 *mtg* 的融合

Fig. 3 The fusion of SP_{wapA} signal peptide and *mtg*

2.4 连接和大肠杆菌转化后阳性克隆鉴定 质粒 pMA5 与融合片段 SP_{wapA}-*mtg* 分别进行 *Nde*I 和 *Nhe*I 双酶切反应,酶切产物切胶回收,再用 T₄ 连接酶连接,将连接产物转化至 *E. coli* DH5α 中,过夜培养后挑取单菌落,进行菌落 PCR 验证,使用引物 p1 和 p4,扩增目的片段 SP_{wapA}-*mtg*,SP_{wapA} 长度

130 bp, *mtg* 长度 1 200 bp。电泳结果如图 4 所示,目的片段总长度 1 330 bp,与 PCR 所得片段大小一致,说明片段 *SP_{wapA}-mtg* 成功插入到载体 pMA5 上。将 PCR 鉴定正确的阳性克隆接种于 LB+氨苄霉素的液体培养基中,培养过夜,提取质粒送去公司测序。

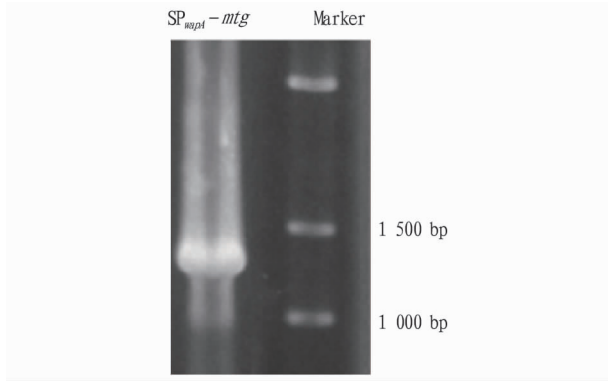


图 4 大肠杆菌菌落 PCR 验证

Fig. 4 PCR validation of *E. coli* colony

2.5 双酶切验证 将测序正确的 pMA5_{*mtg*} 重组质粒转入枯草芽孢杆菌中,在抗性平板上涂布并培养过夜,挑取单克隆接种于 LB+卡那霉素的液体培养基中培养过夜,提取质粒,进行 *Nde*I 和 *Nhe*I 双酶切验证。电泳结果如图 5 所示,重组质粒 pMA5_{*mtg*} 经双酶切作用后有 2 条清晰的条带,较小的片段大小为 1 300 bp 左右,较大的片段为 7 100 bp 左右,与 *SP_{wapA}-mtg* 大小(1 330 bp)和 pMA5 片段大小(7 107 bp)相符,且其 DNA 片段测序结果显示所插入的序列完全正确。

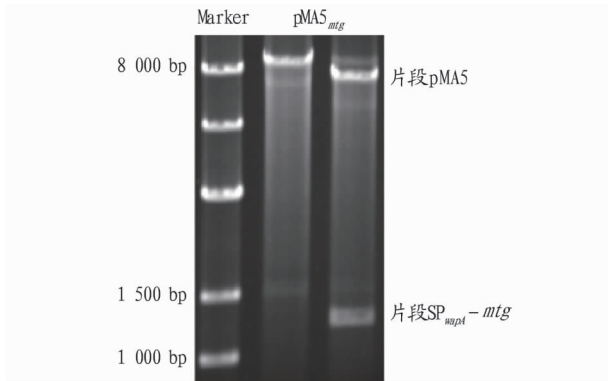


图 5 重组质粒双酶切验证

Fig. 5 Double restriction enzyme digestion of recombinant vector

3 讨论

谷氨酰胺转氨酶是催化蛋白质或多肽间发生共价交联反应的转移酶,可促进蛋白质凝胶化,在食品、医药、化妆品等领域有广泛应用^[7-8]。微生物来源的谷氨酰胺转氨酶是目前研究的热点,但存在成本高、活力低、稳定性差等问题^[9]。利用分子生物学技术对 MTG 基因进行改造并实现异源表达是目前最为有效的方法^[10-11]。

该试验通过基因工程技术在大肠杆菌中构建 pMA5_{*mtg*} 重组载体,再将其转入枯草芽孢杆菌中,从而获得重组表达菌株。这为 MTG 在革兰氏阳性菌中的表达研究提供了依据,同时也证明了枯草芽孢杆菌作为异源蛋白工业生产的宿主具有很大的潜力,是一个有意义的研究性课题。

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] GASPAR A L C, DE GÓES-FAVONI S P. Action of microbial transglutaminase (MTGase) in the modification of food proteins: A review [J]. *Food Chem*, 2015, 171: 315-322.
- [3] JAROS D, PARTSCHEFELD C, HENLE T, et al. Transglutaminase in dairy products: Chemistry, physics, applications [J]. *J Texture Stud*, 2006, 37 (2): 113-155.
- [4] YANG M T, CHANG C H, WANG J M, et al. Crystal structure and inhibition studies of transglutaminase from *Streptomyces mobaraense* [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286 (9): 7301-7307.
- [5] GUERRA-RODRÍGUEZ E, VÁZQUEZ M. Evaluation of a novel low-cost culture medium containing exclusively milk, potato and glycerol for microbial transglutaminase production by *Streptomyces mobaraensis* [J]. *Chem Eng Res Des*, 2014, 92 (4): 784-791.
- [6] LIU L, LIU Y F, SHIN H D, et al. Developing *Bacillus* spp. as a cell factory for production of microbial enzymes and industrially important biochemicals in the context of systems and synthetic biology [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97 (14): 6113-6127.
- [7] GRIFFIN M, CASADIO R, BERGAMINI C M. Transglutaminases: Nature's biological glues [J]. *Biochem J*, 2002, 368 (Pt 2): 377-396.
- [8] HONG G P, XIONG Y L. Microbial transglutaminase-induced structural and rheological changes of cationic and anionic myofibrillar proteins [J]. *Meat Sci*, 2012, 91 (1): 36-42.
- [9] MACEDO J A, SETTE L D, SATO H H. Purification and characterization of a new transglutaminase from *Streptomyces* sp. isolated in Brazilian soil [J]. *J Food Biochem*, 2011, 35 (4): 1361-1372.
- [10] MARX C K, HERTEL T C, PIETZSCH M. Soluble expression of a pro-transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* in *Escherichia coli* [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2007, 40 (6): 1543-1550.
- [11] ITAYA H, KIKUCHI Y. Secretion of *Streptomyces mobaraensis* pro-transglutaminase by coryneform bacteria [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 78 (4): 621-625.

(上接第 91 页)

- [5] 李梦阳, 彭冠云, 邓彪, 等. 水稻维管束的研究进展 [J]. *植物生理学报*, 2017, 53 (9): 1586-1590.
- [6] 杨泽峰, 周勇, 梁国华, 等. 陆生植物 TAL 基因的水平转移起源及对水稻维管束发育和产量性状的作用 [C]// 内蒙古民族大学、浙江省生物信息学会. “农业健康与环境”组学大数据整合生物信息学研讨会论文集. 杭州: 浙江省科学技术协会, 2017.
- [7] 马玲. 水稻维管束发育相关基因 AVB 的图位克隆与功能分析 [D]. 重庆: 西南大学, 2016.
- [8] SINGER S D, HILY J M, COX K D. The sucrose synthase-1 promoter from *Citrus sinensis* directs expression of the β -glucuronidase reporter gene in

phloem tissue and in response to wounding in transgenic plants [J]. *Planta*, 2011, 234 (3): 623-637.

- [9] LIU X Q, XU X, WANG C T, et al. A novel family of gene expression induced by methyl Jasmonate in tobacco (*Nicotiana tabacum*) [C]// The international conference on status of plant, animal & microbe genome research XI. San Diego: [s. n.], 2003: 833.
- [10] 谭艳平, 叶莲, 何福收, 等. 烟草维管束发育相关基因 Nvas 启动子顺式作用元件鉴定 [J]. *中南民族大学学报 (自然科学版)*, 2018, 37 (2): 31-35.
- [11] CHEN J Y, LI N Y, MA X F, et al. The ectopic overexpression of the cotton Ve1 and Ve2-homolog sequences leads to resistance response to verticillium wilt in *Arabidopsis* [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 844.