

茶氨酸生物合成基因工程菌的构建及重组酶的表达

李勤^{1,2}, 黄建安^{1,2}, 李娟^{1,2}, 刘仲华^{1,2*}

(1. 湖南农业大学 园艺园林学院, 湖南 长沙 410128; 2. 茶学教育部重点实验室, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 将来源于 *Escherichia coli* DH5 α 的 γ -谷氨酰转肽酶基因克隆到高表达质粒 pET-32 α 中, 并转化 *E. coli* BL21, 构建茶氨酸生物合成的基因工程菌。工程菌在温度为 20 $^{\circ}\text{C}$, $OD_{600\text{nm}}$ 为 1.5, IPTG 浓度为 0.1 mmol/L, 培养基初始 pH 为 7 的条件下, 诱导培养 6 h, γ -谷氨酰转肽酶的酶活力达 (4.41 ± 0.17) U/mL, 大约是出发菌株 *E. coli* DH5 α 的 18.4 倍。直接以工程菌为催化剂, 在 200 mmol/L 谷氨酰胺、1.5 mol/L 乙胺盐酸盐、pH 10、20 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下, 反应 6 h, 茶氨酸合成量达 12.6 mg/mL, L-谷氨酰胺转化率为 41.05 %。

关 键 词: 茶氨酸; 工程菌; γ -谷氨酰转肽酶; 重组质粒; 重组酶

中图分类号: S571.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)03-0267-04

Construction of genetically engineered *Escherichia coli* strain for the biosynthesis of theanine

LI Qin^{1,2}, HUANG Jian-an^{1,2}, LI Juan^{1,2}, LIU Zhong-hua^{1,2*}

(1. College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Key Laboratory of Tea Science of Ministry of Education, Changsha 410128, China)

Abstract: The γ -Glutamyltranspeptidase gene from *Escherichia coli* DH5 α was cloned in pET-32 α vector and expressed in *Escherichia coli* BL21. When the recombinant strain grew at pH 7 to obtain the $OD_{600\text{nm}}$ of 1.5 and induced with 0.1 mmol/L IPTG at 20 $^{\circ}\text{C}$ for 6 h, the activity of γ -Glutamyltranspeptidase was (4.41 ± 0.17) U/mL, about 18.4 times than that of *Escherichia coli* DH5 α . Under the catalysis of cells of the genetically engineered strain and under the pH 10, the temperature of 20 $^{\circ}\text{C}$ and the incubation time of 6 h, the yield of theanine from L-Gln (200 mmol/L) and ethylamine (1.5 mol/L) was 12.6 mg/mL, and the rate of conversion from L-glutamine to theanine was 41.05%.

Key words: theanine; engineered strain; γ -Glutamyltranspeptidase; recombinant plasmid; recombinase

茶氨酸(theanine, N-乙基- γ -L-谷氨酰胺)是茶树中一种特殊的氨基酸, 在其他植物中罕见, 具有降压安神、缓解生理及心理紧张、抗肿瘤以及拮抗咖啡碱引起的神经系统兴奋等重要生理功能^[1-2], 应用前景十分广阔。从茶叶中提取茶氨酸成本高昂。茶氨酸的酶性生物合成具有高效性、专一性及副产物少等优势, 日益受到国内外研究学者的重视^[3-4]。笔者将来源于 *E. coli* DH5 α 的 γ -谷氨酰转肽酶基因(γ -Glutamyltranspeptidase, GGT)克隆到高

表达质粒 pET-32 α 中, 并转化 *E. coli* BL21, 构建茶氨酸生物合成的工程菌, 旨在为利用重组工程菌大规模生产茶氨酸奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

主要材料和试剂: *E. coli* K-12、*E. coli* BL21、pET-32 α 均来自北京鼎国; pMD18-T 来自 TaKaRa 公司; 质粒小量抽提试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、

收稿日期: 2010-12-01

基金项目: 国家自然科学基金(30871572); 国家“973”计划前期研究专项(2008CB117007); 湖南农业大学人才科学基金(07WD22)

作者简介: 李勤(1983—), 男, 湖南岳阳人, 博士研究生, 主要从事茶叶功能成分研究; *通信作者, larkin-liu@163.com

Taq DNA 聚合酶来自上海生工生物工程技术服务有限公司; *Kpn* I 和 *Xho* I 限制性内切酶来自东洋纺生物科技有限公司; 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG); 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺来自 Promega 公司; 蛋白质相对分子质量标准来自上海生工生物工程技术服务有限公司; γ -谷氨酰转肽酶活性测定试剂盒来自长城试剂公司。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 方 法

1.2.1 *GGT* 基因的克隆及重组质粒的构建

以 NCBI 上公布的 *E.coli* K-12 的 *GGT* 基因序列为模版设计引物^[5]。P1(*Kpn* I): 5'-CGCGGTACCATGATAAAACCGACGTTTTTACGCCG-3'; P2(*Xho* I): 5'-GCC TCGAGTTTAGTACCCCGCCGTTAAA TCA TCC-3', 下划线表示加入的 *Kpn* I 和 *Xho* I 酶切位点。以 *E.coli* DH5 α 菌液为模板扩增 γ -谷氨酰转肽酶的 PCR 反应体系: *E.coli* DH5 α 菌液 0.5 μ L, 10 \times PCR Buffer 2.5 μ L, 4 dNTP (10 mmol/L) 1 μ L, *Taq* DNA 聚合酶(2 U/ μ L) 0.5 μ L、引物(10 μ mol/L) 各 1 μ L, 加 ddH₂O 至 25 μ L。扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。经琼脂糖凝胶电泳后, 将目的条带回收、纯化, 并连入 pMD18-T 载体, 送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。将经测序验证的 *GGT* 基因片段从 pMD18-T 载体上酶切下来, 并连入高表达载体 pET-32 α 中(将重组质粒命名为 pET-32 α /*GGT*), 转化 *E.coli* BL21 感受态细胞, 少量制备质粒 DNA, 双酶切验证后, 送上海生工生物工程技术服务有限公司测序确认。

1.2.2 表达产物的 SDS-PAGE 分析

重组质粒 pET32 α /*GGT* 转化宿主菌 *E.coli* BL21 后, 37 $^{\circ}$ C 培养 3 h, 加入终浓度 0.1 mmol/L IPTG, 20 $^{\circ}$ C 诱导 6 h; 对照菌株不加入 IPTG, 其他条件一致。采用渗透压法分离周质蛋白^[6], 用 5% 浓缩胶和 12% 分离胶进行不连续垂直平板电泳, 考马斯亮蓝

R-250 染色, 具体方法参见文献[7]。

1.2.3 重组质粒在大肠杆菌中表达条件的优化

1) 诱导时间。将重组菌单菌落置于含 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养; 次日按 1 : 100 转接后, 继续培养 3 h 至 $OD_{600\text{ nm}}$ 约为 0.6, 加入 IPTG 至终浓度 0.1 mmol/L, 30 $^{\circ}$ C 分别诱导 2、4、6、8 h 后, 收集菌体, 测定 *GGT* 活性。

2) 诱导剂 IPTG 浓度。将重组菌培养至 $OD_{600\text{ nm}}$ 约为 0.6(方法同上); 分别加入 IPTG 至终浓度 0.1、0.5、1.0、1.5 mmol/L, 30 $^{\circ}$ C 诱导 6 h 后, 收集菌体, 测定 *GGT* 活性。

3) 诱导温度。将重组菌培养至 $OD_{600\text{ nm}}$ 约为 0.6(方法同上); 加入 IPTG 至终浓度 0.1 mmol/L, 分别于 10、20、25、30、37 $^{\circ}$ C 诱导 6 h 后, 收集菌体, 测定 *GGT* 活性。

4) 初始 pH。将重组菌培养至 $OD_{600\text{ nm}}$ 约为 0.6(方法同上); 加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L, 于 20 $^{\circ}$ C 在初始 pH 分别为 6、7、8、9 的 LB 培养基中诱导 6 h 后, 收集菌体, 测定 *GGT* 活性。

5) 诱导时期($OD_{600\text{ nm}}$)。将重组菌单菌落于含 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养; 次日按 1 : 100 转接后, 37 $^{\circ}$ C 培养至 $OD_{600\text{ nm}}$ 分别为 0.25、0.6、1.0、1.5、2.0, 加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L, 在初始 pH 为 7 的 LB 培养基中, 20 $^{\circ}$ C 诱导 6 h 后, 收集菌体, 测定 *GGT* 活性。

1.2.4 *GGT* 活性的测定

用长城试剂公司的 *GGT* 活性测定试剂盒测定 *GGT* 活性。

1.2.5 工程菌催化合成茶氨酸的方法

以诱导后超声破碎的菌体为粗酶液合成茶氨酸。将适量粗酶液加入到含有 200 mmol/L 谷氨酰胺和 1.5 mol/L 乙胺盐酸盐的 pH 10 的茶氨酸合成反应体系中, 37 $^{\circ}$ C 反应 5 h, 离心收集上清, HPLC 检测茶氨酸含量^[8]。

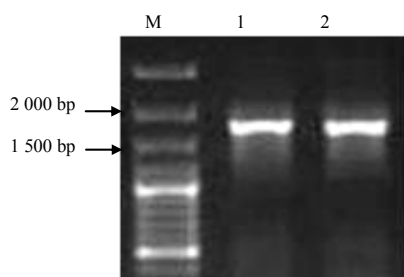
1.3 数据分析

采用 DPS 统计软件分析试验数据。

2 结果与分析

2.1 *GGT* 基因的 PCR 扩增

GGT 基因 PCR 产物电泳结果(图 2)显示,成功扩增出 1 条约 1 700 bp 的特异性条带,与预测的大小一致。将扩增获得的 *GGT* 基因克隆到 pMD18-T 进行测序。测序结果与 *E.coli* K-12 的 *GGT* 基因比对,相似率为 99.7%,表明 *E.coli* DH5 α 的 *GGT* 基因的 PCR 扩增成功。



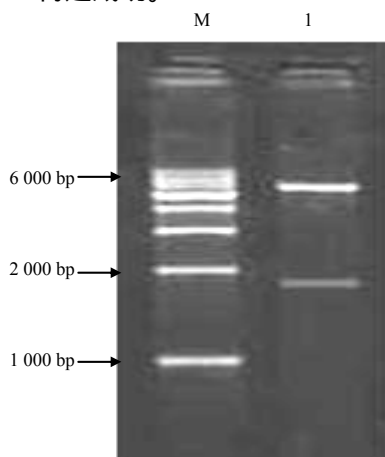
M DNA marker; 1,2 *GGT* 的 PCR 产物。

图 1 *GGT* 基因 PCR 产物的电泳图谱

Fig.1 PCR product of *GGT* gene

2.2 含 *GGT* 基因重组质粒 pET-32 α /*GGT* 的构建及酶切验证

经双酶切验证(图 3)和进一步测序,结果表明插入目的片段正确,且未出现移码,证实重组质粒 pET-32 α /*GGT* 构建成功。



M DNA marker; 1 重组质粒 pET-32 α /*GGT* 的双酶切片段。

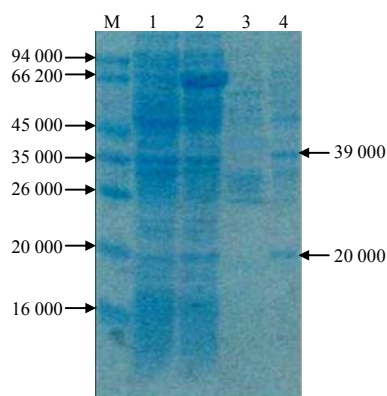
图 2 重组质粒 pET-32 α /*GGT* 双酶切片段的电泳图谱

Fig.2 Double digestion of the recombinant plasmid

2.3 表达产物的 SDS-PAGE 分析

采用 5%浓缩胶及 12%分离胶的不连续垂直平

板电泳,结果(图 4)显示 2 号泳道在 65 000、39 000、20 000 处出现明显条带,4 号泳道在 39 000、20 000 处出现明显条带,其中 65 000 处条带为 *GGT* 前体,39 000 和 20 000 处 2 条谱带分别为 *GGT* 的大亚基与小亚基,与预期结果一致,说明构建的重组工程菌成功表达了 *GGT*。



M 蛋白质 marker; 1 未诱导全菌; 2 诱导后全菌; 3 未诱导工程菌周质蛋白; 4 诱导后工程菌周质蛋白。

图 3 工程菌表达产物的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.3 SDS-PAGE analysis of proteins

2.4 *GGT* 表达条件的优化

经优化(图 4),工程菌诱导的最佳条件为:诱导温度 20 $^{\circ}\text{C}$, IPTG 浓度 0.1 mmol/L,培养基初始 pH7,诱导 $OD_{600\text{ nm}}$ 1.5,诱导时间 6 h。在此条件下,*GGT* 的酶活性可达 (4.41 ± 0.17) U/mL。

2.5 工程菌 *GGT* 活性检测

工程菌经最佳条件诱导后,*GGT* 活性可达 (4.41 ± 0.17) U/mL,出发菌 *E.coli* DH5 α 的 *GGT* 活性为 (0.24 ± 0.28) U/mL。工程菌 *GGT* 活性是出发菌 *E.coli* DH5 α 的 18.4 倍。

2.6 茶氨酸合成检测

工程菌催化合成茶氨酸反应结束后,用 HPLC 检测茶氨酸含量,工程菌茶氨酸合成量达到 12.6 mg/mL, L-谷氨酰胺转化率为 41.05%。

3 结论与讨论

构建了高效表达重组 *GGT* 的基因工程菌,并利用谷氨酰胺和乙胺为底物合成了茶氨酸。同时,

从诱导表达 *GGT* 活力的角度出发,优化了 *GGT* 的表达条件。在诱导温度为 20 ℃,IPTG 浓度为 0.1 mmol/L, $OD_{600\text{ nm}}$ 为 1.5, 初始 pH 为 7 的条件下,诱导 6 h,工程菌的 *GGT* 活力可达 (4.41 ± 0.17) U/mL,是出发菌 *E.coli* DH5 α 的 18.4 倍。*GGT* 广泛分布于各种生物组织中,是谷胱甘肽代谢过程中的一个关键酶,它既可以催化 γ -谷氨酰基化合物上的 γ -谷氨酰基团,使其转移至氨基酸等受体上,也可以催化 γ -谷氨酰基化合物水解反应,生成谷氨酸^[10]。目前,已有多种细菌中的 *GGT* 被用作目的化合物的生物催化剂^[3, 6, 11-12]。由于 *GGT* 可以广泛用于多种功能成分的生物催化剂,因此,提高其酶活力可有效提高各种功能成分的生产效率。本试验茶氨酸产量偏低,可能是茶氨酸合成体系是直接采用 Suzuki H 等未经优化的体系所致^[3]。进一步对茶氨酸合成体系进行优化后,茶氨酸合成量有望提高。

参考文献:

- [1] Kakuda T. Neuroprotective effects of the green tea components theanine and catechins[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2002, 25(12): 1513-1518.
- [2] Kimura K, Ozeki M, Juneja L, et al. L-Theanine reduces psychological and physiological stress responses[J]. Biological Psychology, 2007, 74(1): 39-45.
- [3] Suzuki H, Izuka S, Miyakawa N, et al. Enzymatic production of theanine, an "umami" component of tea, from glutamine and ethylamine with bacterial γ -glutamyltranspeptidase[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 31(6): 884-889.
- [4] Yao Y, Weng Y, Hu H, et al. Expression optimization and biochemical characterization of a recombinant γ -glutamyltranspeptidase from *Escherichia coli* Novablue[J]. The Protein Journal, 2006, 25(6): 431-441.
- [5] 王贤波, 王丽鸳, 成浩, 等. 茶氨酸生物合成工程菌构建[J]. 茶叶科学, 2007, 27(1): 61-66.
- [6] 郭亮, 沈微, 王正祥, 等. 生物转化法生产茶氨酸的重组大肠杆菌的构建[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(2): 41-45.
- [7] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002: 880-887.
- [8] 龚雨顺, 黄建安, 崔湘兴, 等. 离子对色谱法测定茶叶中的茶氨酸[J]. 茶叶科学, 2008, 28(2): 89-92.
- [9] Hashimoto W, Suzuki H, Yamamoto K, et al. Effect of site-directed mutations on processing and activity of γ -glutamyltranspeptidase of *Escherichia coli* K-12[J]. Journal of Biochemistry, 1995, 118(1): 75.
- [10] Suzuki H, Hashimoto W, Kumagai H. Glutathione metabolism in *Escherichia coli*[J]. Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic, 1999, 6(3): 175-184.
- [11] Tachiki T, Yamada T, Mizuno K, et al. γ -Glutamyl transfer reactions by glutaminase from *Pseudomonas nitroreducens* IFO 12694 and their application for the syntheses of theanine and γ -glutamylmethanamide[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1998, 62(7): 1279-1283.
- [12] 王娜, 张洁, 沈微, 等. γ -谷氨酰转肽酶(*GGT*)基因工程菌的构建及其发酵条件的初步研究[J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26(11): 48-53.

责任编辑: 王赛群