DOI:10.11918/j.issn.0367-6234.201611051

茂原链霉菌 *luxR* 基因对 TGase 生物合成的作用

张莉丽[1],薛 慧[2],邸 维[3],张功圣[1],刘 宁[1],韩 雪[3]

(1.东北农业大学 食品学院,哈尔滨 150030;2.黑龙江中医药大学 佳木斯学院,
黑龙江 佳木斯 154007;3.哈尔滨工业大学 化工与化学学院,哈尔滨 150090)

摘 要: 前期研究表明,$MgCl_2$胁迫不但可以提高 TGase 的产量,还会影响微生物次级代谢产物合成的一个重要调节因子 LuxR 家族蛋白的表达.为了研究 LuxR 家族蛋白对茂原链霉菌(*Streptomyces mobaraensis*) TGase 生物合成以及菌体生长的调控作用,利用 pKC1139 为载体,构建 *luxR* 基因阻断质粒,通过 PEG 介导的质粒转化将其转入 *S. mobaraensis* 原生质体中,利用单交换同源重组法将整个重组质粒插入到茂原链霉菌基因组中构建 *S. mobaraensis luxR* 家族蛋白基因阻断突变菌.利用菌体干重法对比突变菌和野生菌菌体生长变化,利用比色法研究两株菌 TGase 生物合成的变化,找到 LuxR 家族蛋白基因表达与 TGase 生物合成之间的关系.结果发现,本研究采用单交换同源重组的方法可以成功地构建出 *S. mobaraensis luxR* 基因阻断突变菌株.通过对比野生菌与阻断菌株生长和 TGase 活力的变化发现阻断 *luxR* 基因会导致菌体生长受阻,TGase 合成延迟,并且表达量显著下降.这些研究结果表明本文研究的 *luxR* 基因可能是 *S. mobaraensis* 合成 TGase 必不可少的正向调控因子.

关键词: 茂原链霉菌;谷氨酰胺转氨酶;*luxR* 基因;生物合成

中图分类号: TS214.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0367-6234(2018)02-0173-05

Effects of *luxR* gene in the biosynthesis of transglutaminase in *Streptomyces mobaraensis*

ZHANG Lili[1], XUE Hui[2], DI Wei[3], ZHANG Gongsheng[1], LIU Ning[1], HAN Xue[3]

(1.College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;
2.Jiamusi College, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Jiamusi 154007, Heilongjiang, China;
3.School of Chemistry and Chemical Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

Abstract: Our previous studies indicated that $MgCl_2$ stress could not only increase the yield of TGase, but also affect the expression of LuxR family protein, which is an important regulator of microbial metabolism. In order to study the effects of LuxR family protein on the biosynthesis of TGase, the *luxR* gene disruption plasmid was constructed with the vector of pKC1139. The plasmid was transferred into the protoplasts of *Streptomyces mobaraensis* by PEG mediated transformation. The recombinant plasmid was inserted into the genome of *Streptomyces* by a single exchange of homologous recombination. The cell growth and TGase activity of *luxR* gene disruption mutant of *S. mobaraensis* were compared with the wild stain. The results showed that the *luxR* gene disruption mutant was successfully constructed, and that the block of the *luxR* gene leads to a decrease of the biomass, a synthesis delaying and expression decrease of TGase. These results showed that *luxR* gene might be an important positive factor on TGase production.

Keywords: *Streptomyces mobaraensis*; transglutaminase; *luxR* gene; biosynthesis

谷氨酰胺转氨酶(Transglutaminase,TGase)是食品加工领域中重要的蛋白酶,它能够催化酰基转移反应、脱酰胺基反应和蛋白质分子内或分子间谷氨酰胺与赖氨酸残基间的交联反应[1].这些催化反应能够使食品基质中蛋白质发生深刻的变化,改善其结构,提高热稳定性、凝胶性、持水性等,甚至能够引入必需氨基酸来提高食物的营养价值[2-4],因此,在食品工业中应用广泛,在纺织业、组织工程等领域具有良好的发展前景[5-6].目前 TGase 的主要来源是通过链霉菌发酵生产,为了获得理想的 TGase 产量,国内外研究者们不断投身于高产菌株筛选、培养基及发酵条件优化、诱变育种等研究中[7-9],但 TGase 产量低、酶活力不足仍然是发酵生产 TGase 面临的主要问题,单纯通过外界因素诱导 TGase 合成不能从根本上解决产量问题.现代生物技术的飞速发展为研究微生物发酵开辟了新的思路.借助该技术可以从基因水平分析目的产物的合成机制,以及合成过程中的调控机制,再通过基因工程技术对菌体基因组进行合理改造,从而有针对性地提高目标产物的合成量.

前期研究发现,在 $MgCl_2$ 胁迫条件下,

收稿日期: 2016-11-18
基金项目: 国家自然科学基金(31301545/C200207);中国博士后基金(2014M560244);黑龙江省博士后基金(LBH-Z13042);中国博士后基金国际交流项目(20150082)
作者简介: 张莉丽(1981—),女,博士,副教授;
刘 宁(1960—),男,教授,博士生导师;
韩 雪(1978—),女,副教授,博士生导师
通信作者: 刘 宁,ningliuneau@outlook.com;
韩 雪,xhan@hit.edu.cn

*S. mobaraensis*提前合成 TGase,并且产量提高,同时 $MgCl_2$胁迫会影响 LuxR 家族蛋白的合成[10].LuxR 家族蛋白作为一类转录调控蛋白,与多种微生物的次级代谢产物合成密切相关[11-13].但是目前没有关于 LuxR 家族蛋白对 *S. mobaraensis* 的生长以及其 TGase 合成作用的研究.为了探索 LuxR 家族蛋白与 *S. mobaraensis* TGase 合成之间的关系,本研究通过基因重组技术阻断 *S. mobaraensis luxR* 基因,构建突变菌.通过分析突变菌与野生菌株在 $MgCl_2$培养条件和普通培养条件下的 TGase 活力和菌体合成情况,初步探讨 LuxR 家族蛋白对 TGase 合成的调控作用,为其实际应用奠定理论基础.

1 实 验

1.1 菌种与质粒

TGase 生产菌 *S. mobaraensis* 购于日本 NBRC 公司; *Escherichia coli* DH5α 购自 TIANGEN 公司,大肠杆菌-链霉菌穿梭质粒 pKC1139、*E. coli* ET12567 (pUZ8002)系本实验室保存.

1.2 试剂

KOD-Plus-Neo PCR 反应试剂盒购自 TOYOBO; T4 DNA 连接酶、200 bp DNA Ladder、1 kb DNA Ladder、DNA 纯化回收试剂盒购自 TIANGEN;限制性内切酶 *Hind* III、*Eco* RI 购自 Thermo Fisher;阿泊拉霉素(Apramycin,Am)购自 Sigma-Aldrich;上海生工提供引物合成及测序技术支持.

1.3 培养基

LB 培养基用于 *E. coli* 液态培养;麦康凯培养基用于大肠杆菌转化子筛选;YEME 培养基用于液态培养 *S. mobaraensis* 以制备原生质体;R2YE 培养基用于 *S. mobaraensis* 原生质体再生;高氏一号培养基用于 *S. mobaraensis* 固态培养,当用于 *S. mobaraensis* 转化子筛选时需加入相应的抗生素;种子培养基、普通发酵培养基和 $MgCl_2$ 发酵培养基[10] 用于 *S. mobaraensis*发酵生产 TGase.

1.4 获取 *luxR* 基因片段

根据链霉菌属 *luxR* 基因保守序列设计正向测序引物 P1:5'-TTCCTCCTGGACGACCACGAA-3'和反向引物 P2:5'-CCGGTTGGTGAGCCCCTCAC-3'.以 *S. mobaraensis*总 DNA 为模板进行基因扩增,然后对扩增产物进行测序和比对分析,验证是否为 *luxR* 基因.验证准确后,根据该基因序列设计正、反引物 P3 和 P4,并分别引入 *Hind* Ⅲ、*Eco* RI 酶切位点,该扩增产物将作为同源臂与质粒连接,命名为 Δ*luxR*.所有的 PCR 反应均在 50 μL 反应体系中进行,其中含模板 DNA 200 ng 和正、反引物各10 μmol/L.PCR 反应条件为:94 ℃,2 min;98 ℃,10 s;57 ℃,30 s;68 ℃,30 s/kb;68 ℃,10 min;25~45 个循环.

1.5 构建基因阻断质粒

将回收纯化的 Δ*luxR* 与质粒 pKC1139 分别经 *Hind* Ⅲ、*Eco* RI 双酶切处理后,进行酶连反应,然后转化 *E. coli* DH5α,麦康凯培养基抗性(50 μg/mL Am)筛选出单菌落,经 PCR 和质粒双酶切验证后,得到重组质粒.将重组质粒转化 *E. coli* ET12567 (pUZ8002),再提取获得去甲基化基因阻断质粒,命名为 pKC1139-Δ*luxR*.

1.6 转化与鉴定

参照文献[14]制备 *S. mobaraensis* 原生质体并采用 PEG 介导的方式进行质粒转化.将转化反应液涂布 R2YE 培养基经再生培养后,利用抗性高氏一号培养基(30 μg/mL Am)培养,筛选出转化子并进行 PCR 验证.由于野生型 *S. mobaraensis* 基因组中不含 Apramycin 抗性基因 *aac*(3)IV,当重组质粒上的 Δ*luxR* 与其发生同源单交换时,质粒基因也会随之整合到 *S. mobaraensis* 基因组上,使其携带 *aac*(3)IV 基因.因此,根据 *aac*(3)IV 基因设计引物 P5:5'-TGCAATACGAATGGCGAAAAG-3',P6:5'-TCGGCCCAGTTGACCCAGGG-3'用来鉴定转化子.

此外,重组质粒所携带的为 *luxR* 基因的部分片段,5'端缺少 240 bp 片段.以 *luxR* 基因 5'端引物 P1 为正向引物,*aac*(3)IV 基因 3'端引物 P6 为反向引物,以阳性转化子 DNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 产物则应包括 *luxR* 上游基因、质粒中的 *luxR* 基因片段及 Apramycin 抗性基因,该方法用于鉴定转化子的整合方式.

1.7 *luxR* 基因阻断对 *S. mobaraensis* 生长的影响

将 *S. mobaraensis* 野生菌和 *luxR* 基因阻断突变菌分别进行斜面固体培养,得到新鲜孢子后接种到种子培养基中,48 h 后取种子培养物分别接种到普通发酵培养基和 $MgCl_2$发酵培养基中继续培养,其间每 24 h 取一次样测定菌体生物量,绘制细胞生长曲线.菌体生物量(DCW)测定参见文献[9].

1.8 *luxR* 基因阻断对 *S. mobaraensis* TGase 产量的影响

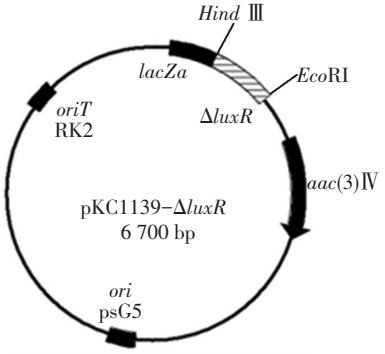
按 1.7 方法培养 *S. mobaraensis* 野生菌和 *luxR* 基因阻断突变菌,其间每 24 h 取一次样测定发酵液中 TGase 活力,绘制酶活力变化曲线.TGase 活力测定采用分光光度法[15].

2 结果与讨论

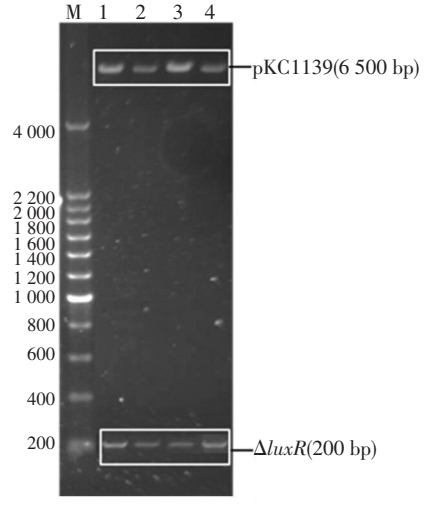
2.1 构建基因阻断质粒

按照 1.3 的方法利用引物 P1 和 P2 对

*S. mobaraensis*基因组进行 PCR 反应,得到 500 bp 产物,测序后经比对与 *Streptomyces rimosus* 来源的 LuxR family transcriptional regulator 的氨基酸序列匹配度高,证明为 *luxR* 基因.根据该基因序列设计正向引物 P3:5'-TTT AAGCTTCGGGGCCTCGGGTTATGT-3'(下划线为 *Hind* Ⅲ 位点)和反向引物 P4:5'-AAA GAATTCGATCCGCCGTTCCTGCTC-3'(下划线为 *Eco* RI 位点),以 *S. mobaraensis* DNA 为模板进行基因扩增,得到 200 bp *luxR* 基因片段 Δ*luxR*.然后按照 1.5 的方法将 Δ*luxR* 与质粒载体 pKC1139 连接,构建重组质粒 pKC1139-Δ*luxR*,见图 1(a)所示.重组质粒经双酶切后能够得到 6.5 kb 载体片段和 200 bp 的同源臂片段,如图 1(b)所示,证明基因阻断质粒构建成功.



(a) 阻断质粒 pKC1139-Δ*luxR* 示意



(b) pKC1139-Δ*luxR* 双酶切验证结果

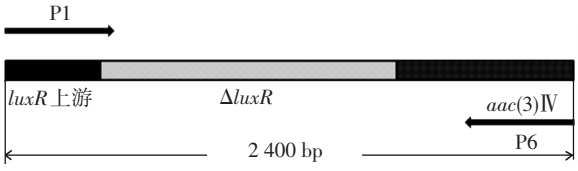
图 1　阻断质粒 pKC1139-Δ*luxR*

Fig.1　Recombinant plasmids pKC1139-Δ*luxR*

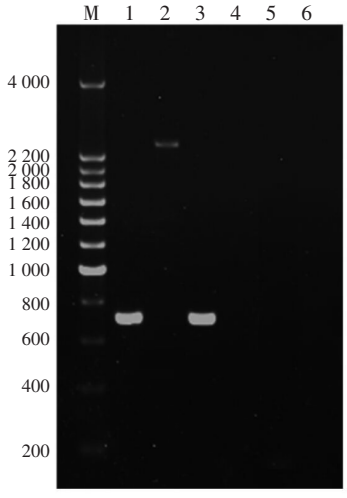
2.2　重组菌的构建、筛选与验证

按照 1.6 的方法将重组质粒转化到 *S. mobaraensis*原生质体,然后利用 R2YE 培养基 30 ℃条件下进行再生培养,得到的单菌落接种抗性高氏一号培养基(30 μg/mL Am)30 ℃条件下连续传代 4 次.由于 pKC1139-Δ*luxR* 带有温敏型启动子,当培养温度超过 37 ℃时,该游离质粒不能自我复制,该重组质粒的 *luxR* 基因片段与链霉菌染色体上的同源区段发生同源重组时,整个质粒可通过单交换的方式插入到染色体上的 *luxR* 基因中,质粒上所携带的 *aac*(3)Ⅳ 抗性基因也就能够表达,取第四代转化子继续接种抗性高氏一号培养基(30 μg/mL)中,39 ℃条件下培养.

提取转化子 DNA,按照 1.6 的方法进行 PCR 验证.以 *luxR* 基因 5'端引物 P1 为正向引物,以阿泊拉霉素抗性基因 3'端引物 P6 为反向引物,以转化子 DNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 产物则包括了 *luxR* 基因上游、质粒中的 *luxR* 基因片段及阿泊拉霉素抗性基因的核苷酸序列,理论大小为 2.4 kb 左右.结果如图 2(b)所示,转化子 S1 既扩增出了 700 bp 的 *aac*(3)Ⅳ 基因(泳道 1),又扩增出一条 2.4 kb 产物,且验证整合方式的 PCR 产物与理论大小(图 2(a))一致(泳道 2).而转化子 S2 只扩增出 700 bp的 *aac*(3)Ⅳ 基因(泳道 1.将转化子 S1 的 2.4 kb扩增产物进行测序比对,证明 pKC1139-*luxR*2 已经整合到 *S. mobaraensis* 基因组中,*luxR* 基因阻断菌构建成功.



(a) PCR 验证整合方式示意



泳道 1、2 为转化子 S1;泳道 3、4 为转化子 S2;5、6 为野生菌

(b) PCR 验证结果

图 2　突变菌 PCR 验证

Fig.2　PCR identification of recombinant

2.3　*luxR* 基因阻断对 *S. mobaraensis* 生长的影响

菌体生长曲线结果显示(图 3),普通发酵培养中的野生菌和重组菌生长周期一致,24~96 h 菌体迅速生长处于对数期,96 h 后生长趋于平缓进入稳

定期.虽然野生菌和重组菌生长趋势相似,但在同一时间点的野生菌生物量显著高于突变菌($P<0.05$),发酵到 96 h 时野生菌生物量达到最大(10.89 g/L),重组菌生长到 120 h 生物量最大也仅为 8.04 g/L.将野生菌和重组菌接种到 $MgCl_2$ 发酵培养基中后,对菌体生长周期没有影响,相同菌株其生物量也没有显著差异($P>0.05$).这些结果表明,阻断 *luxR* 基因会抑制 *S. mobaraensis* 生长.

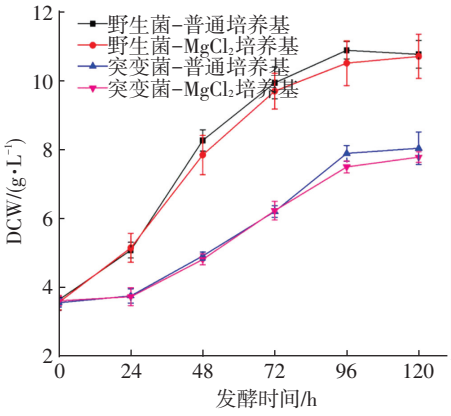


图 3　野生菌及重组菌在不同发酵培养基中的生长曲线

Fig.3　Growth curves of wild strain and *luxR* gene disruption mutant in the different fermentation media

2.4　*luxR* 基因阻断对 *S. mobaraensis* 发酵生产 TGase 的影响

S.mobaraensis 发酵生产 TGase 酶活力变化曲线(图 4)显示,生长在普通发酵培养基中的野生菌在对数生长期 TGase 活力逐渐增加,96 h 发酵液中 TGase 活力达到最大(0.9 U/mL),96 h 后随着菌体生长进入稳定期,TGase 活力不再升高.相比普通培养基,生长在 $MgCl_2$ 发酵培养基中的野生菌在 24~96 h 期间 TGase 活力增长速度更快,96 h 后增长速度放缓,发酵结束时 TGase 活力达到最高(2.8 U/mL),相对普通发酵培养基其 TGase 活力提高了 211%.然而重组菌在普通发酵培养基和 $MgCl_2$ 培养基中几乎没有酶活产生.这些结果表明,*luxR* 基因阻断显著影响 TGase 合成,并且 $MgCl_2$ 胁迫不能提高重组菌 TGase 产量.

LuxR 家族蛋白是一类在细菌群体感应机制中起重要作用的调控蛋白,它影响着微生物的生长繁殖、毒性因子、次级代谢产物和生物膜的形成以及胞外蛋白的合成[12].研究表明,在链霉菌发酵过程中,LuxR 家族蛋白可以作为抗生素产量的调控因子,在基因水平上对次级代谢产物进行调控.He 等[16]研究发现 LuxR 家族蛋白对格尔德霉素的产生具有正调控的作用.Yu 等[17]研究发现阻断 LuxR 家族蛋白调控因子的表达降低了 *S. avermitilis* 合成寡霉素(oligomycin)的能力,然而阿维菌素(avermectin)的产量却升高了 4 倍.这些结果表明,*luxR* 基因对于链霉菌的产物合成可以是一种双向调节因子,对于 *S. mobaraensis*生产 TGase 来说可能是一种正向调控因子.

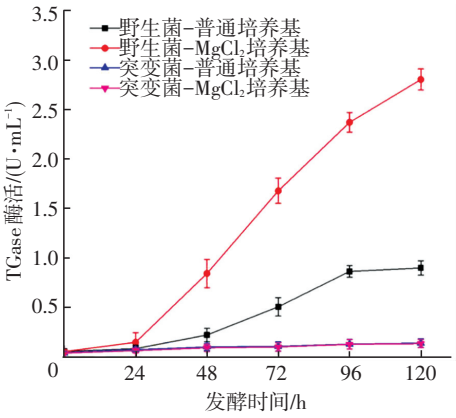


图 4　野生菌及重组菌在不同发酵培养基中的 TGase 产量变化

Fig.4　Changes of TGase production of wild strain and *luxR* gene disruption mutant in the different fermentation media

3　结　语

以 pKC1139 为载体构建 *luxR* 基因阻断质粒,通过 PEG 介导的质粒转化将其转入 *S. mobaraensis* 原生质体中,单交换同源重组法将整个重组质粒插入到链霉菌基因组中以阻断 *luxR* 基因的表达,可以成功构建出 *S. mobaraensis luxR* 基因阻断突变菌.通过对比野生菌和阻断菌株在两种不同培养基中生长和产酶情况,发现阻断 *luxR* 基因会抑制 *S. mobaraensis* 菌体的生长,并且 TGase 合成受到抑制.这些结果表明,本文研究的 *luxR* 基因可能是 *S. mobaraensis* 合成 TGase 必不可少的正向调控因子.

参考文献

[1] ANDO H, ADACHI M, UMEDA K, et al. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1989, 53(10): 2613-2617.

[2] ZHU Y, TRAMPER J. Novel applications for microbial transglutaminase beyond food processing[J]. Trends in Biotechnology, 2008, 26(10): 559-565.

[3] DEJONG G A H, KOPPELMAN S J. Transglutaminase catalyzed reactions: Impact on food applications[J]. Journal of Food Science, 2002, 67(8): 2798-2806. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb08819.x.

[4] GASPAR A L C, GOES-FAVONI DE S P. Action of microbial transglutaminase (MTGase) in the modification of food proteins: A review[J]. Food Chemistry, 2015, 171: 315-322. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.09.019.

[5] GEMBEH S V, FARRELL H M, TAYLOR M M, et al. Application

of transglutaminase to derivatize proteins: 1. Studies on soluble proteins and preliminary results on wool[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005, 85(3): 418-424. DOI: 10.1002/jsfa.1999.

[6] DU G, CUI L, ZHU Y, et al. Improvement of shrink-resistance and tensile strength of wool fabric treated with a novel microbial transglutaminase from *Streptomyces hygroscopicus*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40(7): 1753-1757. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2006.12.001.

[7] ZHANG L, ZHANG L, HAN X, et al. Enhancement of transglutaminase production in *Streptomyces mobaraensis* as achieved by treatment with excessive $MgCl_2$[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(6): 2335-2343. DOI: 10.1007/s00253-011-3790-5.

[8] ZHU Y, RINZEMA A, TRAMPER J, et al. Fed-batch fermentation dealing with nitrogen limitation in microbial transglutaminase production by *Streptoverticillium mobaraense* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1998, 49(3): 251-257.

[9] ZHU Y, RINZEMA A, TRAMPER J, et al. Medium design based on stoichiometric analysis of microbial transglutaminase production by *Streptoverticillium mobaraense* [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1996, 50(3): 291-298. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19960505)50:3<291::AID-BIT8>3.0.CO;2-B.

[10] ZHANG L, ZHANG L, YI H, et al. Enhancement of transglutaminase production in *Streptomyces mobaraensis* dsm 40587 by non-nutritional stress conditions: Effects of heat shock, alcohols, and salt treatments[J]. Korean Journal of Chemical Engineering, 2012, 29(7): 913-917. DOI: 10.1007/s11814-011-0274-3.

[11] CHEN J, XIE J. Role and regulation of bacterial LuxR-like regulators[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2011, 112(10): 2694-2702. DOI: 10.1002/jcb.23219.

[12] SANTOS C L, CORREIA-NEVES M, MORADAS-FERREIRA P, et al. A walk into the luxr regulators of actinobacteria: Phylogenomic distribution and functional diversity[J]. PLoS ONE, 2012, 7(10): e46758. DOI: 10.1371/journal.pone.0046758.

[13] YU Q, BAI L, ZHOU X, et al. Inactivation of the positive luxr-type oligomycin biosynthesis regulators olmri and olmrii increases avermectin production in *Streptomyces avermitilis* [J]. Chinese Science Bulletin, 2012, 57(8): 869-876. DOI: 10.1007/s11434-011-4865-5.

[14] 侯孝仑, 刘雅清, 郭玮婷, 等. 原生质体融合提高产谷氨酰胺转氨酶菌株产量[J]. 食品科学, 2016(3): 145-150.
HOU Xiaolun, LIU Yaqing, GUO Weiting, et al. Strain improvement by protoplast fusion for enhanced transglutaminase production[J]. Food Science, 2016(3): 145-150.

[15] FOLK J E, COLE P W. Structural requirements of specific substrates for guinea pig liver transglutaminase[J]. Jounal of Biological Chemistry, 1965, 240(7): 2951-2960.

[16] HE W Q, LEI J, LIU Y Y, et al. The luxr family members gdmri and gdmrii are positive regulators of geldanamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus* 17997[J]. Archives of Microbiology, 2008, 189(5): 501-510. DOI: 10.1007/s00203-007-0346-2.

[17] YU Q, BAI L Q, ZHOU X F, et al. Inactivation of the positive luxr-type oligomycin biosynthesis regulators olmri and olmrii increases avermectin production in *Streptomyces avermitilis*[J]. Chinese Science Bulletin, 2012, 57(8): 869-876. DOI: 10.1007/s11434-011-4865-5.

(编辑　刘　彤)