

doi:10.3969/j.issn.1001-4616.2018.02.014

GGT 酶法合成 γ -谷氨酰半胱氨酸

韦光绪,唐毅,殷志敏

(南京师范大学生命科学学院,生物化学与生物制品研究所,江苏省分子与医学生物技术重点实验室,江苏南京 210023)

[摘要] 以大肠杆菌 K-12 基因组中克隆表达的 γ -谷氨酰转肽酶作为催化剂,L-谷氨酰胺和胱氨酸为底物合成 γ -谷氨酰半胱氨酸,经还原生成 γ -谷氨酰半胱氨酸.考察反应时间、酶浓度、补料方式等可能对酶促反应过程产生影响的因素,在 L-谷氨酰胺 0.1 mol/L、胱氨酸 0.2 mol/L、酶浓度 0.024 U/mL 及 pH 为 10.0 的条件下,40 °C 反应 12 h, γ -谷氨酰半胱氨酸的最大浓度为 6.13 g/L,L-谷氨酰胺的最大转化率为 24.5 %.

[关键词] γ -谷氨酰转肽酶, γ -谷氨酰半胱氨酸,胱氨酸,酶法合成

[中图分类号]Q555.3 [文献标志码]A [文章编号]1001-4616(2018)02-0078-05

Enzymatic Synthesis of γ -Glutamyl Cysteine with GGT

Wei Guangxu, Tang Yi, Yin Zhimin

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Institute of Biochemistry and Biological Products,
Jiangsu Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, Nanjing 210023, China)

Abstract: Gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), which was cloned from the genome of *E. coli* K-12, was used as a catalyst to synthesis γ -glutamylcystine, with L-glutamine and cystine as the substrate. After the reduction reaction and γ -glutamylcystine was synthesized. We studied the effects of reaction time, initial enzyme concentration, feed mode of L-glutamine on the enzymatic process and find that the maximal production of GGC would be 6.13 g/L and the conversion rate of L-glutamine would be 24.5 %, when the initial reaction conditions of 0.1 mol/L of L-glutamine, 0.2 mol/L of cystine and 0.024 U/mL of GGT, and the reaction is carried out at pH 10.0 and 40 °C for 12 h.

Key words: γ -glutamyl transpeptidase, γ -glutamylcystine, cystine, enzymatic synthesis

还原型谷胱甘肽(GSH)由 L-谷氨酸、L-半胱氨酸、甘氨酸组成,是最具生物学价值的小分子肽.作为组织中主要的非蛋白巯基化合物,GSH 能够清除组织中的氧自由基,稳定含巯基的酶及降低细胞因子的氧化损伤^[1].因此,谷胱甘肽的代谢和调节对细胞内的氧化还原极为重要^[2].

γ -谷氨酰半胱氨酸(GGC)作为体内合成谷胱甘肽(GSH)的中间产物,同时含有 γ -谷氨酰基和巯基,其功能与 GSH 类似.研究表明 GSH 无法有效地进入细胞,且半胱氨酸在细胞外极易氧化成难溶的、具有毒性的胱氨酸,与直接提供 GSH 和半胱氨酸前药相比,GGC 能够进入细胞利用胞内的谷胱甘肽合成酶直接合成 GSH,对于提高细胞内 GSH 水平更为有效.因此,GGC 在医药、食品及化妆品等领域具有广泛的应用前景^[3].

近年来 GGC 的生产方式主要为酵母菌发酵法、化学合成法和 CCT 催化合成法 3 种.酵母发酵法一般以糖类为原料,发酵周期长、产物浓度低、提取困难^[4-5];化学合成法以谷氨酸和半胱氨酸为原料经过侧链基团保护、缩合接肽、脱保护进行合成,步骤繁琐,耗能大且安全性低^[6];由于 GGT 具有位点专一性强、不需要辅酶、不消耗 ATP 等特点,已被广泛应用于谷氨酰基化产品的生产.2006 年 Wallace Bridge 等以谷氨酸乙酯和巯基乙醇还原的半胱氨酸为底物,利用 GGT 酶催化合成 GGC,收率可以达到 30 %左右,已基本实现了工业化^[7].2008 年吴明刚等报道了以谷氨酰胺和 S-苄基半胱氨酸为底物,利用 GGT 酶催化合成 S-苄基- γ -谷氨酰半胱氨酸(S-Bzl-GGC),再脱除苄基制备产物 GGC,收率可以达到 29 %左右^[8].

收稿日期:2018-02-26.

基金项目:江苏省科技厅前瞻性研究项目(BY2013001-03).

通讯联系人:殷志敏,博士,教授,研究方向:生物化学及细胞生物学. E-mail:yinzhimin@njnu.edu.cn

本工作利用在大肠杆菌 *Rosetta* (DE3) 中高效表达的 GGT 酶以 L-谷氨酰胺和胱氨酸为底物催化反应,再通过二硫苏糖醇还原,两步反应得到终产物 GGC,简化了 GGC 合成的工艺流程。

1 材料和方法

1.1 主要材料

大肠杆菌 *E. coli* K-12 和 *Rosetta* (DE3) 由本实验室自行筛选和保藏;GGC 标品, Sigma;Gln, 实验室自制;胱氨酸, 色谱纯, 上海生工;二硫苏糖醇, 上海生工;基因工程试剂盒, Axgenty; γ -GT 检测试剂盒, 南京建成;乙腈、甲醇等均为国产分析纯。

1.2 GGT 的重组表达

在 NCBI 中查询大肠杆菌 K-12 的 γ -谷氨酰转肽酶基因序列, 根据目的基因序列设计引物并引入酶切位点:

Kpn I 上游引物: GGGGTACCATGATAAAACCGACG;

Xho I 下游引物: CCCTCGAGTTAGTACCCCGCCG.

从大肠杆菌中克隆获得 γ -谷氨酰转肽酶基因 *ggt*, 构建重组表达质粒 pET32a(+)-*ggt*, 并转化到大肠杆菌 *Rosetta* (DE3) 中, 以 1:100 比例接种于 1 L 的 LB 培养基中, 37 °C、220 rpm 发酵 2 h~3 h, 在菌体浓度 OD 600 大约为 0.6~0.8 左右时加入复配诱导剂, 26 °C、220 r/min 发酵 8 h 诱导蛋白表达, 超声破碎细胞得到粗酶液放入 -80 °C 保存。

1.3 重组 GGT 酶活力的测定方法

GGT 催化谷氨酰对硝基苯胺 (γ -GpNA) 中 γ -谷氨酰基转移给 N-甘氨酸甘氨酸, 生成对硝基苯胺, 在 405 nm 有特征光吸收。1 个活力单位 (U) 定义为每分钟催化 γ -GpNA 水解生成 1 μ mol 对硝基苯胺所需的酶量, 因此通过紫外分光光度计测定 405 nm 光吸收增加速率来计算 γ -GT 酶活性^[9]。

1.4 目的产物 GGC 浓度检测方法

(1) 产物的 HPLC 分析方法

色谱柱为 Agilent SB-C₁₈, 5 μ m, 4.6×250 mm; 流动相为甲醇/水 (含 0.1% 乙酸) = 5/95; 流速为 0.6 mL/min; 检测器为紫外检测器; 检测波长为 220 nm; 进样量 20 μ L; 柱温 25 °C。

(2) 待测样品的处理方法

使用移液器吸 100 μ L 发酵液置于 1.5 mL 离心管中, 100 °C 加热 3 min 终止反应, 加入 300 μ L 0.5 mol/L 的二硫苏糖醇 (DTT) 摇匀, 室温静置 1 h~2 h. 待充分还原后使用 0.2 μ m 滤膜过滤, 进行 HPLC 检测。

1.5 重组 GGT 酶学性质的研究

1.5.1 GGT 最适反应温度

配制底物溶液浓度均为 0.1 mol/L, GGT 酶浓度均为 0.024 U/mL, 分别在 30 °C、35 °C、40 °C、45 °C、50 °C、55 °C 下反应 30 min, 通过 HPLC 检测产物浓度, 以测得的最大反应速率为 100 %, 推算出各温度下的相对酶活。

1.5.2 GGT 的热稳定性

将 GGT 酶液分别在 20 °C、30 °C、40 °C、50 °C 和 60 °C 水浴保温, 每隔 1h 取出一组样品, 进行酶活测定, 以初始酶活为 100 %。以相对酶活力为纵坐标, 温度为横坐标。

1.5.3 GGT 最适反应 pH 值

配制底物溶液浓度均为 0.1 mol/L, GGT 酶浓度均为 0.024 U/mL, 分别在 pH 为 7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 下反应 30 min, 通过 HPLC 检测产物浓度, 以测得的最大反应速率为 100 %, 推算出各 pH 下的相对酶活。

1.6 GGT 催化合成 GGC 的反应条件优化及表征

1.6.1 反应时间对 GGT 催化合成 GGC 反应的影响

采用 100 mL 的反应体系, 将 Gln 和 Cys-Cys 溶解于水中, 用氢氧化钠调 pH 至 10.0, Gln 浓度为 0.1 mol/L, Cys-Cys 浓度为 0.2 mol/L, 加入 GGT 酶液使反应体系中酶的终浓度为 0.024 U/mL, 40 °C, 220 r/min 温控摇床反应, 定时取样, 通过 HPLC 对产物浓度进行分析。

1.6.2 GGT 酶浓度对 GGT 催化合成 GGC 反应的影响

采用 100 mL 的反应体系,将 Gln 和 Cys-Cys 溶解于水中,用氢氧化钠调 pH 至 10.0,Gln 浓度为 0.1 mol/L, Cys-Cys 浓度为 0.2 mol/L,加入酶液使反应体系中酶的终浓度分别为 0.016 U/mL、0.024 U/mL、0.032 U/mL, 40 °C, 220 r/min 温控摇床反应,定时取样,通过 HPLC 对产物浓度进行分析。

1.6.3 不同加料方式对 GGT 催化合成 GGC 反应的影响

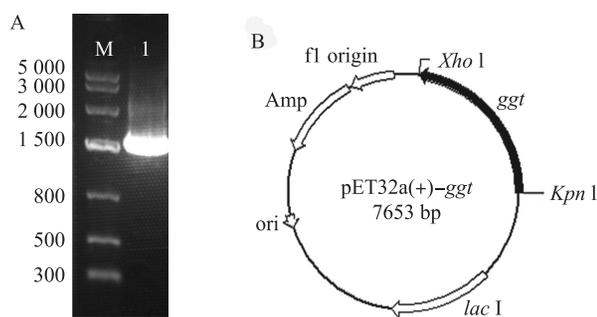
采用 100 mL 的反应体系,将 Cys-Cys 溶解于水中,用氢氧化钠调 pH 至 10.0, Cys-Cys 浓度固定为 0.2 mol/L,加入酶液使反应体系中酶的终浓度为 0.024 U/mL,配制 1mol/L 的 Gln 标准溶液,底物 Gln 的加入分别采用一次性加料、分两次加料、分 4 次加料、流加 4 种不同投料方式。

2 结果与讨论

2.1 GGT 的克隆与表达

2.1.1 *ggt* 基因的克隆

如图 1A 所示,从大肠杆菌 K-12 中克隆获得 γ -谷氨酰转肽酶基因 *ggt* 全长约 1 700 bp,引入 *Kpn* I 和 *Xho* I 酶切位点,以 pET32a(+)为载体构建重组质粒 pET32a(+)-*ggt*(图 1-B)。根据南京思普金生物公司提供的 pET32a(+)的 MCS 上下游序列,利用 T7 promoter primer 和 T7 terminator primer 作为测序引物,进行测序。经南京思普金生物公司整菌测序结果表明,克隆的目的基因片段全长 1 743 bp,与在 NCBI 上 BLAST 检索的 *E. coli* K-12 *ggt* 基因编码序列同源性达 100%。因此,可以确定 *ggt* 基因已经成功克隆到 pET32a(+)载体中,且方向正确。



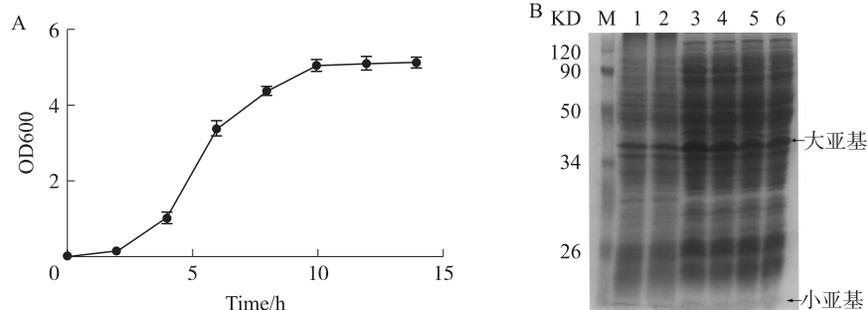
A. M: DNA 分子量标准; 1: *ggt* 目的片段. B. 重组质粒 pET32a(+)-*ggt* 图谱

图 1 *ggt* 基因的克隆

Fig. 1 Cloning of *ggt* from *E. coli* K-12

2.1.2 GGT 的诱导表达

将重组菌以 1%的接种量接入 1 L 的 LB 培养基中,设置摇床转速 220 rpm,温度 37 °C,根据重组工程菌生长曲线(图 2A)可以看出,4 h~10 h 期间重组菌进入对数生长期,菌体进行快速繁殖,10 h 后重组菌生长进入平台期,菌体量基本保持不变,因此在之后培养重组菌的时间控制在 10 h 左右较为合适。菌株复配诱导 8 h 后,收集超声波破壁,通过 SDS-PAGE 检测(图 2B),重组 GGT 的分子量约为 59 kDa,大亚基由 365 个氨基酸残基组成,分子量约为 39 kDa,小亚基由 190 个氨基酸残基组成,分子量约为 20 kDa。利用全自动化学发光图像分析系统对条带灰度扫描分析,GGT 蛋白表达量大约在 37%左右。过 γ -GT 活性检测试剂盒检测重组 GGT 粗酶液酶活大约为 0.8 U/mL,约是出发菌种 *E. coli* K-12 自身 GGT 酶活的 14 倍。



A. 重组工程菌生长曲线. B. M: 蛋白分子量标准; 1, 2: 空载 *E. coli*/pET32a(+) 全菌蛋白; 3, 4: 诱导后 *E. coli*/pET32a(+)-*ggt* 全菌蛋白; 5, 6: 诱导后的 *E. coli*/pET32a(+)-*ggt* 上清蛋白

图 2 GGT 的诱导表达

Fig. 2 Inducing expression of GGT

2.2 重组 GGT 酶学性质的研究

2.2.1 GGT 最适反应 pH

将重组 GGT 在不同 pH 条件下与底物反应后,测定各条件下的活力.不同 pH 对重组 GGT 酶活力的影响如图 3 所示,重组 GGT 最适 pH 在 10.0 左右.

2.2.2 GGT 最适反应温度

将重组 GGT 在不同温度条件下与底物反应后,测定各条件下的活力.从图 4 可知,在实验范围内,GGT 酶催化反应速率随温度的变化均呈先上升后下降的趋势,最适反应温度为 45 °C 左右.

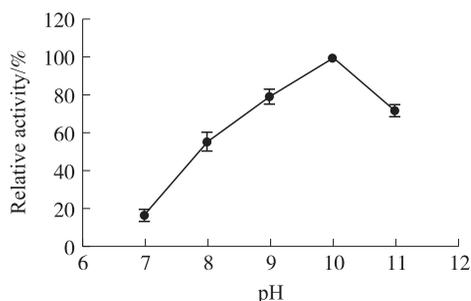


图 3 pH 对 GGT 酶活力的影响

Fig. 3 Effect of pH on recombinant GGT activity

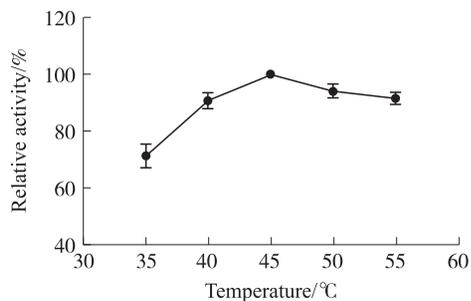


图 4 温度对 GGT 酶活力的影响

Fig. 4 Effect of temperature on recombinant GGT activity

2.2.3 GGT 热稳定性分析

如图 5 所示,通过对重组 GGT 酶的热稳定性分析发现,当温度达到 45 °C 以上时酶活下降迅速,而 40 °C 时酶活相对稳定.因此,在之后的转肽实验中选择 40 °C 作为反应温度.

2.3 GGT 催化合成 GGC 反应条件优化及产物表征

2.3.1 反应时间的影响

由图 6 可以看出,随着反应的进行产物浓度逐渐增加,当反应进行到 12 h 左右时,GGC 浓度达到最大,约为 6.13 g 左右,底物转化率为 24.5%.随着反应时间的延长,产物浓度逐渐降低,这是由于反应体系中除了底物 Gln 外,产物谷氨酰半胱氨酸也能作为谷氨酰供体,与 GGT 酶形成复合物.随后在酶的脱酰基化过程中,受体(Cys-Cys)分子的亲核攻击可释放酶分子,生成产物谷氨酰半胱氨酸(转肽反应);同时水分子亦可以作为亲核试剂参与反应,生成谷氨酸,而谷氨酸不能作为谷氨酰基化反应的供体,因此该过程是不可逆的(水解反应)^[10-11].

在反应前期,Gln 的浓度较大,GGT 更倾向利用 Gln 作为供体,转肽反应占优势;随着反应的继续进行,Gln 消耗以及产物的积累,GGT 开始利用谷氨酰半胱氨酸作为供体,产物水解速率不断上升.当转肽速率和水解速率相等时,产物积累速率为零,此时体系中产物浓度达到最大值,随着反应的进行,水解反应占据优势,产物浓度不断降低.

在反应前期,Gln 的浓度较大,GGT 更倾向利用 Gln 作为供体,转肽反应占优势;随着反应的继续进行,Gln 消耗以及产物的积累,GGT 开始利用谷氨酰半胱氨酸作为供体,产物水解速率不断上升.当转肽速率和水解速率相等时,产物积累速率为零,此时体系中产物浓度达到最大值,随着反应的进行,水解反应占据优势,产物浓度不断降低.

2.3.2 酶浓度的影响

酶浓度对 GGC 合成的影响如图 7 所示,尽管 3 种体系中酶浓度不同,但产物最大浓度基本一致,均在

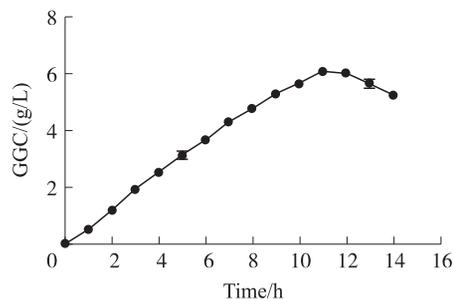


图 6 反应时间对 GGT 催化合成 GGC 反应的影响

Fig. 6 Effect of reaction time on GGC synthesis

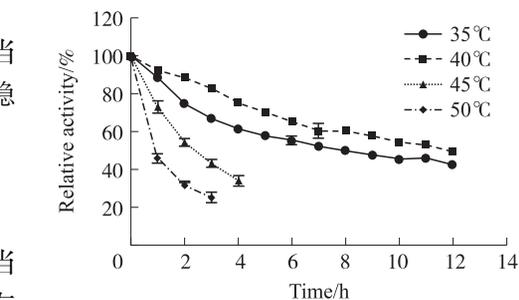


图 5 重组 GGT 的热稳定性

Fig. 5 Thermal stability of recombinant GGT

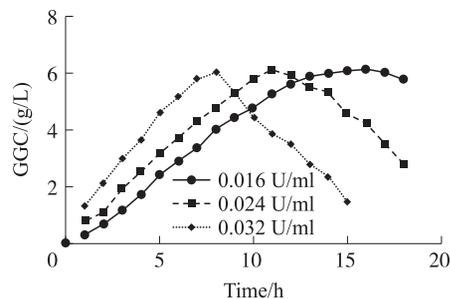


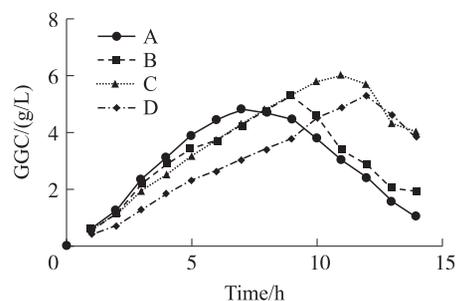
图 7 酶浓度对 GGT 催化合成 GGC 反应的影响

Fig. 7 Effect of GGT concentration on GGC synthesis

6 g/L 左右,只是产物积累速率不同.因此可以认为酶浓度变化可以改变产物积累速率,在酶浓度高的体系中转肽速率和水解速率同时也高,但两者反应的平衡点并未改变.但是酶浓度低的体系中反应平衡期较长,反应易于控制.

2.3.3 投料方式的影响

由图 7 可以看出,分批投料可以有效提高目标产物积累浓度,分两次投料(B)和分 4 次投料(C)的产物最大浓度比一次性投料(A)分别提高了 0.52 g/L 和 1.21 g/L,效果比较明显.分析认为多次分批投料可以保证 Gln 浓度处于适当的水平,不仅可以保证谷氨酰基的供给有效降低水解速率,而且可以降低供体自转肽强度,有利于产物的积累.一次性投料(A)反应前期体系中 Gln 浓度过高,Gln 会作为亲和试剂参与反应,生成 Glu 聚合物(自转肽反应),不利于产物积累.而采用流加式投料(D)并没有显著效果,可能是因为在反应前期酶活性较好,而 Gln 供给不足不利于产物积累.因此,可以得知想要实现产物的高收率必须要保持适当的 Gln 浓度,即同时降低自转反应肽速率和水解反应速率.



A.一次性投料;B.分两次投料;C.分 4 次投料;D.流加式投料

图 8 投料方式对 GGT 催化合成 GGC 反应的影响

Fig. 8 Effect of Gln replenishment on GGC synthesis

2.3.4 产物 GGC 的 HPLC-MS 分析

取 0.1 mL 反应液,99 °C 加热 3 min 中止反应,降低 pH 除去多余的胱氨酸,再加入 0.2 mL 二硫苏糖醇(0.5 mol/L),37 °C 水浴还原. 0.2 μm 滤膜过滤,利用 HPLC-MS 对发酵所得产物进行了鉴定,图 9 为 GGC 粗分离的色谱图,保留时间在 4.9 min 左右,纯度为 67%,与购自 Sigma 公司的 GGC 标准品对比可以初步认为产物为 GGC. 图 10 为产物的质谱图,GGC 的相对分子质量为 250,从图中可以看到 m/s 251.0 为 GGC 的准分子离子 [M+H]⁺. 因此,可以确证所得产品是 GGC.

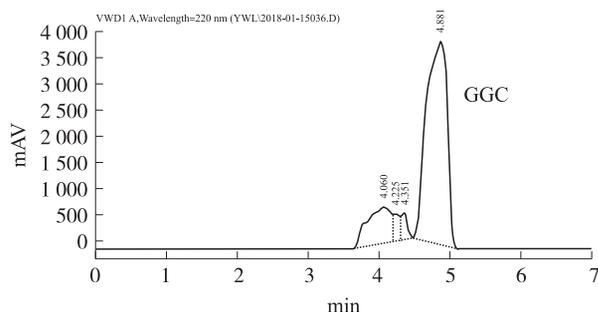


图 9 产物 GGC 的 HPLC 分析

Fig. 9 HPLC analysis of GGC product

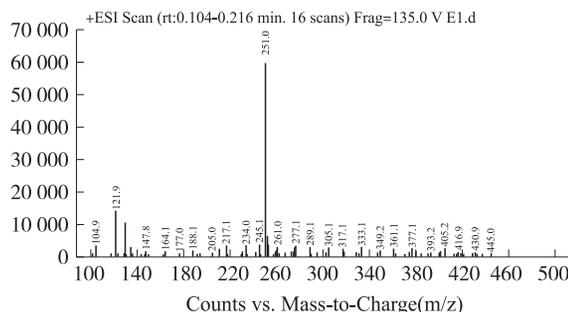


图 10 产物 GGC 的 MS 分析

Fig. 10 MS analysis of GGC product

3 结论

本实验以 *E. coli* K-12 克隆得到的 *ggt* 基因构建工程菌,诱导表达得到 γ-谷氨酰转肽酶(GGT),利用 L-谷氨酰胺和胱氨酸为底物,通过酶促转肽反应合成谷氨酰胱氨酸,并进一步通过二硫苏糖醇还原得到目的产物 γ-谷氨酰半胱氨酸(GGC),最大转化率为 24.5%,简化了 GGC 合成工艺,对 GGC 的工业化生产具有推动作用.并且在对 GGT 酶学性质的研究中发现大肠杆菌来源的 GGT 催化反应的最适温度为 40 °C 左右,最适 pH 在 10.0 左右,对于谷氨酰基化反应的工业化应用具有良好的参考价值.

[参考文献]

[1] PENNINGCKX M J, ELSKENS M T. Metabolism and functions of glutathione in micro-organisms[J]. *Advanced microbiology and physiology*, 1993, 34(34): 239-301.

(下转第 88 页)

- academy of sciences of the United States of America, 1999, 96(17): 9 622-9 627.
- [8] TIAN Q, LIN Y, YANG M, et al. *DlRan3A* is involved in hormone, light, and abiotic stress responses in embryogenic callus of *Dimocarpus longan* Lour[J]. *Gene*, 2015, 569(2): 267-275.
- [9] LIU W, XU Q, CHI Q P, et al. Up-regulated expression of *Ran* reveals its potential role to deltamethrin stress in Kc cells[J]. *Gene*, 2016, 585(1): 1-7.
- [10] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [11] LALITHA S. Primer premier 5[J]. *Biotech software and internet report*, 2000, 1(6): 270-272.
- [12] CHI Q P, LI F L, LIU W, et al. Analysis of *UB* and *L40* resistance related to deltamethrin in *Drosophila* kc cells[J]. *Gene*, 2016, 575: 399-406.
- [13] MARY D. The *Ran* GTPase: theme and variations[J]. *Current biology*, 2002, 12(14): 502-508.
- [14] CLARKE P R, ZHANG C. *Ran* GTPase: a master regulator of nuclear structure and function during the eukaryotic cell division cycle? [J]. *Trends Cell Biol*, 2001, 11(9): 366.
- [15] CICIARELLO M, MANGIACASALE R, LAVIA P. Spatial control of mitosis by the GTPase *Ran*[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2007, 64(15): 1891-1914.
- [16] HELEN S S, PAUL R C. Cell biology: *Ran*, mitosis and the cancer connection[J]. *Current biology*, 2006, 16(12): 466-468.
- [17] PAUL R C, CHUAN M Z. Spatial and temporal coordination of mitosis by *Ran* GTPase[J]. *Nat Rev Mol Cell*, 2008, 9(6): 464.
- [18] ABE H, KAMAI T, SHIRATAKI H, et al. High expression of *Ran* GTPase is associated with local invasion and metastasis of human clear cell renal cell carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2008, 122(10): 2391-2397.
- [19] CHATTERJEE M, PASCHAL B M. Disruption of the *Ran* system by cysteine oxidation of *RCC1*[J]. *Mol Biol Cell*, 2014, 35(3): 566-581.

[责任编辑:黄敏]

(上接第82页)

- [2] YIN L, WEI G Y, CHEN J. Glutathione: a review on biotechnological production[J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2004, 66(3): 233-242.
- [3] 宋希文, 周治, 姚忠, 等. 固定化 γ -谷氨酰转肽酶催化合成 γ -L-谷氨酰-L-半胱氨酸[J]. *化学反应工程与工艺*, 2009, 25(5): 420-425.
- [4] NISHIUCHI H, SUEHIRO M, NISHIMURA Y. Method for producing gamma-glutamylcysteine: 日本, JP2004113155[P]. 2004-11-31.
- [5] NISHIUCHI H, SUGIMOTO R. Gamma-glutamylcysteine producing yeast: 中国台湾, TW264466B[P]. 2006-10-21.
- [6] 焦庆才, 钱绍松, 王先斌, 等. γ -L-谷氨酰-L-半胱氨酸的合成方法: 中国, CN1810769A[P]. 2006-01.
- [7] BRIDGE W J, ZARKA M H. Process for the production of γ -Glutamylcysteine: 澳大利亚, AU2006228996B[P]. 2006.
- [8] 吴明刚, 姚忠, 李松, 等. 化学酶法合成 γ -L-谷氨酰-L-半胱氨酸[J]. *现代化工*, 2008, 28(2): 338-341.
- [9] CLAUDIO J, SUZUKI H, TOCHIKURA T. Excretion and rapid purification of γ -glutamyl transpeptidase from *Escherichia coli* K-12[J]. *Journal of fermentation and bioengineering*, 1991, 72(2): 125-127.
- [10] KEILLOR J W, CASTONGUAY R, LHERBET C. γ -Glutamyl transpeptidase substrate specificity and catalytic mechanism[J]. *Methods Enzymol*, 2005, 401(8): 449-467.
- [11] OKADA T, SUZUKI H, WADA K, et al. Crystal structures of gamma-glutamyl transpeptidase from *Escherichia coli*, a key enzyme in glutathione metabolism, and its reaction intermediate[J]. *Proceedings of the national academy of sciences*, 2006, 103(17): 6471-6476.

[责任编辑:黄敏]