

甜蛋白 Monellin 基因在大肠杆菌中的高效表达

Overexpression of a Sweet Protein Monellin in *Escherichia coli*

陈忠军, 蔡 恒, 路福平*, 杜连祥

CHEN Zhong-Jun, CAI Heng, LU Fu-Ping* and DU Lian-Xiang

天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300222

Tianjin Key Lab of Industrial Microbiology, The College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300222, China

摘 要 根据已报道的单链 monellin 甜蛋白的氨基酸序列, 采用细菌偏爱密码子, 人工合成了全长 294bp 的 monellin 基因。插入到大肠杆菌表达载体 pET-22b 中, 构建重组分泌型表达载体 pETMO。经 IPTG 诱导 pETMO 所含有的甜蛋白基因可在大肠杆菌 BL21(DE3) 中高效表达, 表达量占菌体可溶性蛋白的 44.8%。且经纯化后测定其甜度是蔗糖的 3000 倍。得到的甜蛋白热稳定性及耐酸性均比天然产物有所提高。

关键词 甜蛋白 Monellin, 细菌优化密码子, 重组 PCR, 诱导表达

中图分类号 Q 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)04-0568-05

Abstract According to the amino acid sequence of monellin, a single chain 294bp monellin gene was synthesized and inserted into vector pET-22b to yield the recombinant secretion plasmid pETMO. The single-chain monellin gene was designed based on the biased codons of *E. coli* so that its expression would be then optimized. Under the expressing conditions, monellin was produced accounting for 44.8% of total soluble proteins. The *E. coli*-expressed single-chain monellin is 3000 times sweeter than sucrose. The thermal-stability and acid-resistance of the protein are higher than the natural monellin.

Key words monellin, bacteria preferred condon, recombination PCR, inducing expression

Monellin 是存在于非洲西非植物 *Dioscoreophyllum cumminsii* 中的一种甜蛋白, 1972 年由美国宾州化学味觉中心分离纯化而命名^[1]。它的甜度是蔗糖的 3000 倍。在美国、欧洲和日本等国家主要用在食品加工、饮料、口香糖、蜜饯、糖果、乳制品、保健品、宠物饲料中作为添加剂或药品辅料。与化学合成的甜味剂相比, 其口味纯正、纯天然且无毒无致癌性。Monellin 甜度高, 热量低, 可促进食品的风味, 又不易被细菌所利用, 适于糖尿病、心血管病等患者食用, 且能预防儿童龋齿, 因而它是很有发展

前途的食品添加剂^[2-5]。但由于其自然资源少、产地偏僻、产量低, 无法满足市场需求, 使甜蛋白难以实现大规模的商品化生产。在 20 世纪 80 年代就开始了基因工程表达 Monellin 的研究^[6]。

天然的 Monellin 由两条肽链组成(其中 A 链 44 个氨基酸, B 链 50 个氨基酸), 这两条肽链的耐热性和耐酸性较差, 不太稳定, 因此曾经使得该蛋白的商品化生产发展缓慢。1989 年 Kim 等根据 Monellin 甜蛋白氨基酸序列, 将编码 A、B 两条肽链的核苷酸连接在一起, 在 *E. coli* 中成功的表达出了具有生物活

性的单链 Monellin 甜蛋白^[7]。单链 Monellin 甜度与天然 Monellin 相近,热稳定性有所提高,但 Monellin 的表达效率很低。1992 年 penarrubial 等人^[8]又将该蛋白基因分别通过转基因技术导入土豆和莴苣中,使该基因的表达量接近于总蛋白含量的 1%。

本研究采用大肠杆菌偏爱密码子,人工合成了单链 Monellin 基因,并在大肠杆菌中实现了高效表达。纯化后的重组 monellin 具有很高的甜度,与天然产物相比其稳定性大大提高。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 工具酶和试剂: Protein Marker、核酸分子量标准、氨苄青霉素、IPTG 均购自上海 Sangon 公司;各种限制酶、T4DNA 连接酶、TaqDNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司;所用试剂盒购自 Promega 公司。

1.1.2 菌株和质粒: 表达质粒 pET-22b,大肠杆菌菌株 BL21K(DE3)购自博大公司,菌株 BMC33 由本实验室构建。

1.1.3 培养基: LB 液体培养基用于细菌培养,在 LB 培养基中添加 1.5% 的琼脂粉即为 LA 培养基, LB 培养基在需要时加入氨苄青霉素 50 μ g/mL, LA 培养基加倍。

1.2 方法

1.2.1 单链 Monellin 基因的设计与合成: 根据对 Monellin 的空间构象分析,设计合适的蛋白融合方案。采用大肠杆菌偏爱密码子,设计寡核苷酸片段 F1、F2、R1、R2,并在基因两端的引物 P1、P2 导入限制性内切酶位点 *Bam*H I、*Nco* I 和 *Eco*R I,以重组 PCR 合成完整的单链 Monellin 基因。

F1: 5'-atggcgaatgggaaatcatcgacatcggtccgttcaccagaacctgggtaagtgcgctgttagc-3'

R1: 5'-tcgtagatggtcttttcatgcacggacgataacctgtgaaggtcagacgaccgtactggccgattttgtttctctgcaacagcgaacttacc-3'

F2: 5'-atgaaaaagaccatctactgaagaaaacggttccgtgaaalcaagggtt acgaataccagctgtacgtttacgcttcgacaagctgttccgtgctgacatctccgaag-3'

R2: 5'-ttacggcggcgaaccggaccgttgaaacgcagcagcttacgaccacgggtctttagtcttcggagatgctcagcagc-3'

(其中下划线分别代表了核苷酸片的重叠部分)

上游引物 P1 5'-cgggatccatggcgaatgggaaatcatcg-3'

*Bam*H I *Nco* I

下游引物 P2 5'-cggaattcttacggcggcgaaccg-3'

*Eco*R I

1.2.2 Monellin 基因的克隆及表达载体的构建:

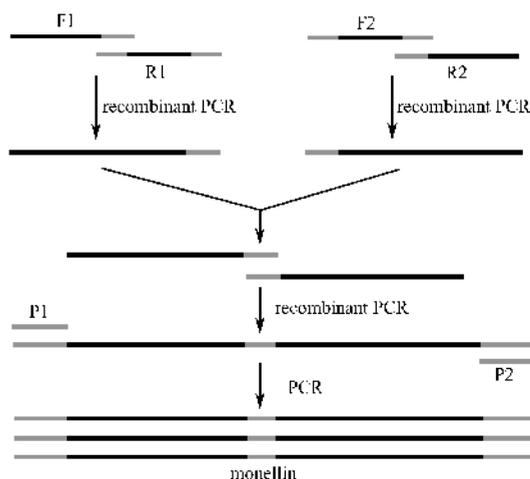


图 1 Monellin 基因 PCR 合成示意图

Fig.1 PCR strategy of monellin gene synthesis

PCR 产物经 1.2% 琼脂糖电泳分离,并割胶回收纯化后,以 *Nco* I 和 *Eco*R I 双酶切 PCR 产物及表达质粒 pET-22b,以 T4 DNA Ligase 连接片断构建重组表达质粒 pETMO。转化大肠杆菌 BL21K(DE3)感受态细胞,在含有 100 μ g/mL Amp 的 LA 培养基平板上挑取单克隆在 5mL LB 培养基中培养,小量制备质粒 DNA,酶切验证后送大连宝生物工程公司测序。所用分子克隆技术参照文献 10 进行。

1.2.3 Monellin 的诱导表达条件的优化: 以阳性转化子为对象,研究诱导前生物量、诱导温度、装液量、诱导时间等条件对 monellin 表达的影响。摸索了实现高效表达的最佳条件。诱导表达后,用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳对菌体进行分析,检测表达结果。SDS-PAGE 分析参照文献 11 进行。

1.2.4 Monellin 的提纯: 超声波破碎培养细胞,离心收集上清液。于 60 $^{\circ}$ C 水浴 10min,再用 0.2mol/L 的乙酸钠调节 pH 为 4.5,4 $^{\circ}$ C 放置 1h 后离心去除沉淀,再将上清液中和至 pH7.0,透析过夜后过 CM Sephadex C-50 柱。用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测提纯效果。

1.2.5 表达蛋白在 BL21K(DE3)中的定位: 利用渗透休克法^[12]将细胞周质空间和膜内成分分离,用 SDS-PAGE 检测蛋白表达情况。

1.2.6 Monellin 的甜度测定: 称取 10mg 纯化 monellin 溶于 100mL 去离子水中,配成 0.01% 的母液,并稀释成不同浓度梯度。分别取 1mL 不同浓度的 Monellin 溶液与同体积 2% (W/V) 蔗糖溶液品尝比较甜度。通过计算获得 Monellin 相对于蔗糖的甜度倍数。

1.2.7 Monellin 性质的初步探讨: 将纯化 Monellin

用无离子水配制成 2% (W/V) 的溶液, 分别在 20℃、30℃、40℃、50℃、60℃、70℃、80℃、90℃ 保温 20min, 测定其甜度。调节 Monellin 溶液的 pH 值分别为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0, 于 25℃ 水浴中保温 1h, 测定其甜度变化。初步确定其热稳性及耐酸性。

2 结果

2.1 含 Monellin 基因的重组质粒的构建及转化

利用所合成的 F1、R1、F2、R2 四条寡核苷酸片段以及 PCR 引物 P1、P2, 按图 1 所示合成 Monellin 基因。Monellin 中所用的氨基酸密码子(见表 2)均为大肠杆菌偏爱性密码子。将所得的扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 2 所示, 可以看到在约 294bp 处出现了一条特异性带, 其大小与目的基因片段大小完全吻合。通过 PCR 纯化试剂盒和凝胶回收试剂盒对 PCR 扩增产物进行纯化后, 用 *Eco*R I 和 *Nco* I 双酶切, 同时质粒 pET-22b 双酶切并用试剂盒纯化回收, 再用 T4DNA 连接酶连接转化 *E. coli* BL21(DE3)。将包含 Monellin 的重组质粒命名为 pETMO。在含氨苄青霉素的 LA 平板上筛选阳性转化子。

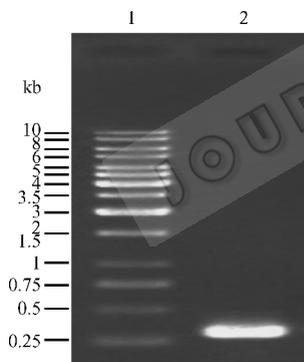


图 2 甜蛋白基因的 PCR 产物

Fig.2 The amplified PCR products of Monellin gene

1: 1kb marker; 2: The amplified products.

2.2 重组质粒及转化子的鉴定分析及 Monellin 的测序结果

培养阳性转化子并提取质粒, 用双酶切后进行琼脂糖电泳分析, 发现重组质粒经双酶切后释放出的一条与 PCR 扩增片段大小一致的片段, 同时在 5.5kb 处存在一条片段与线性的 pET-22b 大小一致, 确证已获得所需重组质粒 pETMO。且取转化子质粒进行 PCR 扩增, 结果表明, 以转化子所提质粒为模板进行 PCR 能扩增出一条特异性电泳带, 大小约为 294bp, 与预期大小相同(图略)。经测序结果可看出, 重组质粒 pETMO 与设计的单链 Monellin 基因

表 2 Monellin 合成中氨基酸的密码子使用方法

Table 2 Codon usage with amino acids in synthesis of Monellin

amino acid sequence	A	nucleotide sequence	B	amino acid sequence	A	nucleotide sequence	B
Met	2	ATG	2	Asn	5	AAC	5
Gly	9	GGC	2	Leu	6	CTG	6
		GGT	7	Lys	9	AAA	2
Glu	9	GAA	9	AAG	7		
Try	1	TGG	1	Ala	3	GCT	3
Ile	8	ATC	8	Val	4	GTT	4
Asp	5	GAC	5	Tyr	7	TAC	7
Pro	6	CCG	6	Arg	7	CGT	7
Phe	6	TTC	6	Cys	1	TGC	1
Thr	4	ACC	4	His	0	-	0
Gln	3	CAG	3	Ser	2	TCC	2

A: the number of amino acids in monellin; B: the number of codon usage with amino acids in monellin.

完全吻合。

2.3 Monellin 的表达与纯化

将 pETMO 转入到大肠杆菌 BL21(DE3) 中, IPTG 诱导表达后总蛋白的电泳分析表明, 在工程菌中明显比只转入了 pET-22b 空载体的对照菌株多表达出了一条大小约为 11kD 的蛋白带, 如图 3 所示, 与文献报道相同^[2]。经研究发现发酵条件对工程菌表达异源蛋白 Monellin 的能力有显著影响。通过比较不同的装液量、诱导前生物量、诱导温度、诱导时间、诱导剂用量等对其表达 Monellin 的能力的影响, 初步优化了菌株 BMC33 的发酵条件: 培养基装液量为 50mL/250mL 三角瓶, 接种量为 1%, 培养菌株至 OD 值达 0.8 时添加诱导剂 IPTG 至终浓度为 0.9mmol/L,

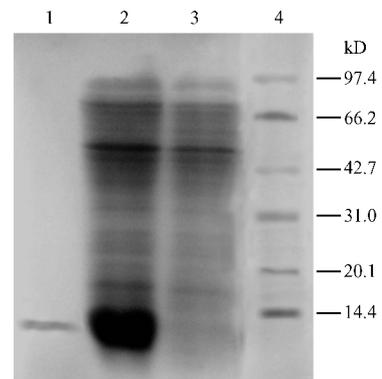


图 3 pETMO 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中的表达及产物纯化的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

Fig.3 Electrophoresis analysis of pETMO expressed in

E. coli BL21(DE3) and the purification of its product

1: purified Monellin; 2: total soluble protein in BL21(DE3) with pETMO;

3: total soluble protein in BL21(DE3) with pET-22b; 4: protein marker.

于 32℃ 诱导 5h。在此优化发酵条件下,菌株 BMC33 可高效表达植物甜蛋白 Monellin。应用 BIO-Rad 公司的 GS-700 凝胶扫描分析系统分析表明,该蛋白质的表达量占细菌可溶性蛋白的 44.8%。将纯化后收集到的 Monellin 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,得到其分子量约为 11kD(见图 3)。

2.4 表达蛋白在 BL21 细胞中的定位

将大肠杆菌 BL21 细胞的周质空间和膜内成分分离后,从 SDS-PAGE 检测结果(图 4)可以看出,目的蛋白存在于周质空间中,说明 BL21(DE3)表达的甜蛋白 Monellin 已分泌到周质空间,即完成了分泌表达。

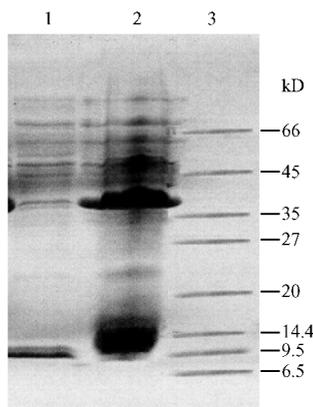


图 4 大肠杆菌 BL21 表达蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of expressed protein in *E. coli* BL21(DE3)

1: total soluble protein in cell membrane; 2: total soluble protein in periplasmic space; 3: protein marker.

2.5 纯化产物性质的初步研究

真空冷冻干燥后样品配制成溶液,通过试验人员双盲测试,得到重组 Monellin 的甜度大于同等重量蔗糖的 3000 倍。

纯化 Monellin 溶液在不同温度处理后的甜度变化情况如图 5。据报道天然 Monellin 在 65℃ 保温 15min 已彻底失去甜味^[13]。而从图中可看出,重组产物在 65℃ 处理 20min 后仍具有甜味。当在 90℃ 保温 20min 后,重组 Monellin 才彻底失去甜味。如果将高温处理时间缩短,在 90℃ 仅保温 3min,则 Monellin 仍然具有甜味。这样的热稳定性使其可以适应于食品中的巴氏杀菌条件,确保了其作为甜味剂应用于食品加工工业生产中。

pH 对 Monellin 甜度的影响见图 6。从图中可以看出,当 pH 值到达 3.0 时 Monellin 仍具有甜味,直至 pH 降到 2.0 时,其甜味才完全消失。这比报道的天然物的耐酸性也有很大提高^[14]。如上所述,单链

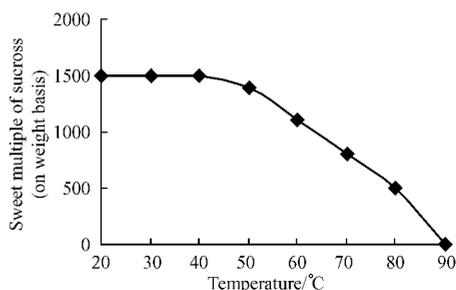


图 5 温度对 Monellin 甜度的影响

Fig.5 Effects of temperature on sweet taste of Monellin

重组 Monellin 的热稳定性及耐酸性均高于天然产物,其在食品生产工业中具有更广泛的应用前景。

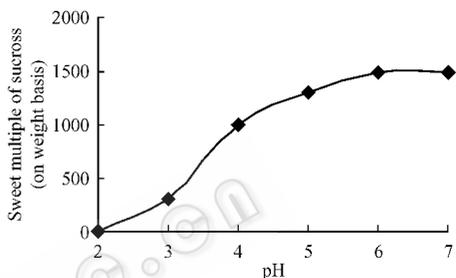


图 6 pH 对 Monellin 甜度的影响

Fig.6 Effects of pH on sweet taste of Monellin

3 讨论

Monellin 作为一种高效非糖的甜味剂,具有现有甜味剂不可替代的优点,具有广阔的市场前景。但是,由于天然产物来源狭窄,无法形成规模效益。加之天然产物热稳定性太差,限制了它的应用范围^[15]。自 20 世纪 80 年代末,基因工程表达的研究开展以来,工作的重点集中在蛋白融合提高热稳定性和高产安全表达方面。先后有美国和日本的研究者设计出了成功的蛋白融合方案。

本研究应用基因工程的手段来获得单链 Monellin 甜蛋白。不同微生物基因中氨基酸的密码子选择具有偏爱性,未经修饰的植物 Monellin 基因中含有许多大肠杆菌稀有密码子,由于相应的 tRNA 在大肠杆菌中含量过低而导致翻译过程中的停顿,从而影响了蛋白在大肠杆菌中高效表达^[16]。通过研究大肠杆菌基因中密码子的使用频率,完全按照细菌的偏爱密码子合成了 Monellin 基因,不含有大肠杆菌稀有密码子,因而该合成基因可在大肠杆菌中高效表达。崔洪志等^[17]利用质粒 pBV221 构建了重组表达载体,并将 Monellin 基因在大肠杆菌中实现了表达,其表达量为可溶蛋白的 22.8%,其纯化方法是采用传统的硫酸铵沉淀的方法。而在本试验

条件下,采用具有 T7 启动子的表达载体 pET-22b 构建的基因工程菌所表达的甜蛋白量占可溶性蛋白的 44.8%。且表达产物分泌到周质空间,未形成包涵体,具有天然 monellin 的甜度,更利于 monellin 的纯化及大规模生产。

本研究所合成的单链 Monellin 的热稳性及耐酸性较强,在食品工业中将有更广阔的应用前景。且利用此性质研究了一种新的提纯方法。即将基因工程菌培养诱导液经超声波破壁后离心取上清液,将此上清液先经热处理,再于低 pH 值下放置一定时间,此时上清液中的其它蛋白已变性沉淀,而 Monellin 仍很稳定,从而将其进行提取纯化。此法提取成本低,纯化的效果理想,为进一步大规模生产降低提取成本奠定了基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Dansby R. Sweet science overexpression of monellin in yeast. *Nature Biotechnology*, 1997, **15** (5) :419 - 420
- [2] Cui HZ(崔洪志), Li M(李敏), Guo SD(郭三堆). The research evolvement of plant sweet proteins. *Bulletin Biotechnologica*(生物技术通报), 1997, **13** (2) :10 - 13
- [3] Fan CS(范长胜). Research on development and application of sweet tasting proteins. *Food and Fermentation Industries*(食品与发酵工业), 2001, **27** (12) :50 - 54
- [4] Hong W(洪薇), Cao JS(曹家树), Liu XJ(刘小杰). The character of sweet tasting proteins and production by biology methods. *Food Science*(食品科学), 2002, **23** (7) :144 - 147
- [5] Qin CQ(钦传光), Ding Y(丁焰), Tang GL(汤国龙). The evolvement of new type sweet additive nonsugar. *World of Chemistry*(化学世界), 1998, **39** (8) :399 - 402
- [6] Fan CS(范长胜), Chen YQ(陈永青), Li S(李爽) et al. The evolvement of gene engineering and exploiting of sweet tasting protein. *Industrial Microbiology*(工业微生物), 1999, **29** (1) :29 - 33
- [7] Kim SH, Kang CH, Kim R et al. Redesigning a sweet protein : increased stability and renaturability. *Protein Engineering*, 1989, **2** (8) :571 - 579
- [8] Penarrubin L, Kim R, Giovannoni J et al. Production of the sweet protein monellin in transgenic plant. *Biol Technology*, 1992, **10** (7) :561 - 564
- [9] Kondo K, Yutaka M, Hidetaka S et al. High-level expression of a sweet protein, monellin, in the food yeast *Candida utilis*. *Nature Biotechnology*, 1997, **15** (5) :453 - 457
- [10] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [11] Wang JZ(汪家政), Fan M(范明). *Technical manual of protein*. Beijing: Science Press, 2002, pp. 77 - 97
- [12] Hansan M, Hsiung Nancy G, Mayne et al. High level express efficient secretion and folding of human growth hormone in *Escherichia coli*. *Biotechnol*, 1996, **16** (10) :991 - 995
- [13] Takashi K, Kazuyoshi M. Amyloid-like aggregates of a plant protein : a case of a sweet-tasting protein, monellin. *FEBS Letters*. 1999, **454** (1 - 2) :122 - 126
- [14] Takashi K. Multistep nucleus formation and a separate subunit contribution of the amyloidogenesis of heat-denatured monellin. *Protein Science*, 2001, **10** :2093 - 2101
- [15] Masanori K, Noriki N, Yasuo A. Complete amino acid sequence of the sweet protein monellin. *Agric Biol Chem*, 1990, **54** (9) :2219 - 2224
- [16] Sui GC(隋广超), Hu MH(胡美浩). The factor of influencing the expression of foreign gene in *E. coli*. *Prog Biochem Biophys*, (生物化学与生物物理进展), 1994, **21** (2) :128 - 132
- [17] Cui HZ(崔洪志), Li M(李敏), Guo SD(郭三堆) et al. Synthesis of a bacterial-like plant monellin gene and its expression in *E. coli*. *Science Agriculture China*(农业科学), 1999, **33** (1) :58