

植物甜蛋白 *des-pGlu1-Brazzein* 的密码子优化及其在毕氏酵母中的表达

李春丽, 韩露, 郑振宇, 赵卫东

河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002

摘要: 根据甜蛋白 *des-pGlu1-Brazzein* 的成熟区氨基酸序列, 按照酵母密码子的偏好优化其编码序列, 合成了 4 对末端具粘合位点的寡聚核苷酸序列, 经连接、PCR 扩增后得到了 179 bp 的 *des-pGlu1-Brazzein* 编码序列, 插入到 pPIC9K 载体中, 构建了重组表达载体 pPIC9K-*Bra*。经酶切、电击转化到毕赤酵母菌 GS115 中。酵母工程菌株经筛选鉴定后诱导表达, 目的蛋白的表达量约占上清总蛋白的 51.6%, 分离纯化后的 *des-pGlu1-Brazzein* 具有一定的甜度。

关键词: 甜蛋白, 毕氏酵母, 表达, 活性检测

Optimization of plant *des-pGlu1-Brazzein* gene according to yeasty biased codons and its expression in *Pichia pastoris*

Chunli Li, Lu Han, Zhenyu Zheng, and Weidong Zhao

College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

Abstract: According to the amino acid sequence of *des-pGlu1-Brazzein*, 4 pairs of oligonucleotide with cosmic site were synthesized by using yeasty biased codons. After linkage and PCR, the 179 bp code area of *des-pGlu1-Brazzein* was obtained and inserted into pPIC9K, which resulted in the recombinant expression vector pPIC9K-*Bra*. By digestion with *Sal* I, the lined pPIC9K-*Bra* was transformed into *Pichia pastoris* GS115 by electric shock. The results of expression indicated that the secreted target protein accounted for 51.6% of total protein in the supernatant and showed biological activity after purification.

Keywords: *des-pGlu1-Brazzein*, *Pichia pastoris*, expression, biological activity

甜蛋白是从热带植物中提取的一类蛋白, 其甜度高, 热量低; 甜味纯正, 口感好; 食用该类蛋白不会使体内血糖升高, 不会引起口腔蛀牙, 无毒副作

用。目前发现的甜蛋白有 7 种, 其中 *Brazzein* (巴西甜) 是 Ming 和 Hellekant 从西非植物 *Pentadiplandra brazzeana* Baillion 的果实中分离得到的一种甜度极

Received: December 2, 2010; **Accepted:** March 24, 2011

Supported by: Basic Research Foundation from the Education Department of Henan Province (No. 2004922043), Doctor Foundation of Henan Agricultural University.

Corresponding author: Chunli li. Tel/Fax: +86-371-63558180; E-mail: hncelli@163.com

河南省教育厅基础研究项目 (No. 2004922043), 河南农业大学博士基金项目资助。

高的蛋白^[1], 它有一种异构体, 由 53 个氨基酸组成 (仅仅缺乏第一个氨基酸, 称为 *des-pGlu1-Brazzein*), 其甜度更高, 是 *Brazzein* 的 2 倍, 以分子量为基础进行比较, 其甜度是蔗糖甜度的 4 000 倍, 以重量为基础进行比较, 其甜度是蔗糖甜度的 1 000 倍^[2-3]。是目前为止所发现甜蛋白中甜度最高、分子量最小、水溶性最好的蛋白, 是一种具有广阔开发前景的甜蛋白。

然而天然甜蛋白的开发生产受到资源、产地的限制, 难以规模化生产, 人工合成的甜蛋白价格昂贵, 限制了它的应用。因此, 利用工程技术生产 *des-pGlu1-Brazzein* 具有重要意义。由于 *des-pGlu1-Brazzein* 发现较晚, 对于其基因工程的研究还较少, 主要是在原核生物大肠杆菌和乳酸球菌中表达^[4-5], 我们也曾经优化了 *des-pGlu1-Brazzein* 的编码序列, 使其在大肠杆菌得到了高效表达^[6-7]。但是存在的主要问题是得到的产物以包涵体的形式存在, 纯化后的 *des-pGlu1-Brazzein* 还需要进一步的复性才具有活性。为克服这些缺点, 本研究按照酵母密码子的偏爱优化了 *des-pGlu1-Brazzein* (*Bra*) 编码序列, 采用目前广泛使用的毕氏酵母 *Pichia pastoris* 作为宿主菌, 构建了 *des-pGlu1-Brazzein* 高效分泌表达的酵母工程菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和载体

4 对编码 *des-pGlu1-Brazzein* 的寡聚核苷酸片段和 2 对引物均由上海生工生物工程有限公司合成。PUC18-T 载体购自上海生物工程公司。pPIC9K 载体和 GS115 酵母菌株购自 Invitrogen 公司。TG1 菌株为本实验室保存菌株。

1.1.2 酶和试剂

T4 DNA 连接酶、T4 多核苷酸激酶、限制性内切酶 *EcoR* I、*Not* I、*EX Taq* 酶购自大连宝生物工程有限公司。PCR 纯化试剂盒购自赛百胜公司。其

他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基

MD 培养基: 1.34% YNB, 0.000 04% 生物素, 2% 葡萄糖, 1.5% 琼脂;

MM 培养基: 1.34% YNB, 0.000 04% 生物素, 0.5% 甲醇, 1.5% 琼脂;

BMGY 培养基: 1% 酵母提取物, 2% 蛋白胨, 1.34% YNB, 0.000 04% 生物素, 1% 甘油, 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液 pH 6.0;

BMMY 培养基: 将 BMGY 中的 1% 甘油用 0.5% 的甲醇替代。

1.1.4 主要仪器和设备

多功能荧光分析系统 (Eagle eye) 及其分析软件 Gel-ProAnalyzer(3.1) 购自美国冷泉港仪器公司, 电击转化仪购自美国伯乐公司。基因的测序由上海生物工程公司完成。

1.2 方法

1.2.1 *des-pGlu1-Brazzein* 基因的设计合成

根据 *des-pGlu1-Brazzein* 的氨基酸序列和酵母对密码子的偏爱设计 4 对编码 *des-pGlu1-Brazzein* 的末端具粘合位点的寡聚核苷酸片段^[8-9], 每段寡聚核苷酸长度 30~59 nt 不等。正负链之间互补区至少 25 nt 以上。在结构基因的两端分别设置了酶切位点 *EcoR* I 和 *Not* I, 在 3'端加上 2 个终止密码子。合成的片段和 2 对引物如表 1 所示。

1.2.2 *des-pGlu1-Brazzein* 基因的克隆和鉴定

除 *Bra-1* 和 *Bra-4'* 的 2 个 5'端片段以外, 其余的 6 个片段均用 T4 多核苷酸激酶磷酸化。所有片段等比例混合后 94 °C 变性 1~2 min 室温冷却, 然后加入 T4 DNA 连接酶于 12 °C~16 °C 连接过夜。以连接反应产物作为模板, 以合成的 *Bra* 和 *Bra'* 为上下游引物按下列条件进行 PCR 反应: 94 °C 热变性 5 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。

PCR 产物纯化后, 与 PUC18-T 载体于 12 °C~16 °C 连接过夜后, 转化 TG1 感受态细胞, 均匀涂布于含 Amp 抗性的 LB 培养基上 (含 X-gal、

表 1 合成的序列

Table 1 The synthesized sequence

Name	Sequence (5'-3')
Bra-1	GAATTCGACAAGTGTAAGAAGGTT
Bra-1'	CTTACACTTGTCTGAATTC
Bra-2	TACGAAAACCTACCCAGTTTCTAAGTGTCAA TTGGCTAACCAATGTAACCTACGACTGT
Bra-2'	GTAGTTACATTGGTTAGCCAATTGACACTTAGAACTGGGTAGTTTTCGTAAACCTT
Bra-3	AAGTTGGACAAGCAGCTAGATCTGGTGA ATGTTTCTACGACGAAAAGAGAACTTG
Bra-3'	TCTCTTTTCGTCGTAGAAACATTCACCAGATCTAGCGTGCTTGTCCAACCTACAGTC
Bra-4	CAATGTATCTGTGACTACTGTGAATACTAATAGGCGGCCGC
Bra-4'	GCGGCCGCCTATTAGTATTCACAGTAGTCACAGATACATTGCAAGTT
Bra	GAATTCGACAAGTGTAAGAAGGTT
Bra'	GCGGCCGCCTATTAGTCTTCAC
AOX ₁	GACTGGTTCCAATTGACAAGC
AOX ₁ '	GCAAATGGCATTCTGACATCC

IPTG), 37 °C 培养过夜。

培养平板上生长的白色菌落, 提取质粒进行 PCR 及其酶切鉴定, 最后进行测序鉴定。

1.2.3 表达载体 pPIC9K-Bra 的构建和鉴定

将测序正确的质粒和 pPIC9K 载体分别进行双酶切, 1.0% 的琼脂糖电泳分别回收目的基因和 pPIC9K 载体, 而后用 T4 DNA 连接酶连接过夜。连接后的产物转化 TG1 感受态细胞, 均匀涂布于含 Amp 的 LB 培养基上。37 °C 培养过夜。

将在含 Amp 的 LB 培养基上生长的菌落培养, 提取质粒同样进行 PCR 检测和酶切检测。最后进行 DNA 测序鉴定。

1.2.4 重组质粒电击转化毕氏酵母

将测序正确的载体用限制性内切酶 *Sal* I 进行酶切, 纯化后取 10 μL 转化 80 μL 的酵母感受态细胞, 电击后立即加入冰冷的 1 mol/L 山梨醇, 取 200~600 μL 涂布于 MD 培养基上, 2~6 d 后观察转化子的生长。

1.2.5 整合转化子的筛选和 PCR 鉴定

挑取在 MD 培养基上生长的菌落, 在 96 孔板中培养, 连续转接 3 次, 使每一个克隆的细胞密度都相同, 然后分别点种 10 μL 于 MM、MD 培养基及其含不同浓度 G418 (0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、3、

4 g/L) 的 YEPD 培养基上, 于 30 °C 培养 2~3 d, 筛选具有高 G418 抗性且生长良好的菌株进行菌落 PCR, 以 AOX₁ 和 AOX₁' 为引物进行检测, 扩增的条件是: 94 °C 1 min, 54 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 30 个循环, 最后 72 °C 10 min。

1.2.6 表达菌株的诱导表达及电泳检测

接种单菌落于 25 mL 的 BMGY 培养基上, 30 °C 培养 OD₆₀₀ 至 2~6 (约 16~18 h), 离心收集菌体, 用等量的 BMMY 培养基悬浮培养, 每日补加甲醇至终浓度为 0.5%, 诱导 6 d, 取样品上清液进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析, 检测表达结果。

1.2.7 *des-pGlu1-Brazzein* 的纯化和活性检测

将获得的 *des-pGlu1-Brazzein* 用透析袋透析, 80 °C 加热 30 min 后离心以获得小分子量的 *des-pGlu1-Brazzein*, SDS-PAGE 检测纯化的情况。通过 6 人品尝, 确定纯化后的 *des-pGlu1-Brazzein* 的甜度^[6], 即将纯化的 *des-pGlu1-Brazzein* 采用 BCA 测定浓度, 而后调整其浓度为 0.02% 的母液 (即 1 mL 水中含 0.02 mg 的纯化蛋白), 进一步获得稀释成 2、4、6、8、10 倍等不同稀释倍数的待测溶液。用 2% 的蔗糖作为对照, 通过品尝确定与之相当的甜度的 *des-pGlu1-Brazzein* 的稀释倍数。计算公式为: 相对甜度=稀释倍数×100。

2 结果与分析

2.1 *des*-pGlu1-Brazzein 的基因合成及其克隆

合成的 *des*-pGlu1-Brazzein 编码序列经 T4 DNA 连接酶连接后作为模板, 以 Bra 和 Bra' 为上下游引物进行 PCR, 产物大小约 180 bp, 与预期相符。回收 PCR 产物, 将其连接到 T 载体上, 构建重组质粒 T-Bra。重组质粒的 PCR 和酶切鉴定结果如图 1 所示。PCR 扩增和双酶切的结果都证明目的基因连接在 T 载体上。最后测序的结果表明所连接的目的基因与所设计的基因序列完全一致。

2.2 表达载体 (pPIC9K-Bra) 的鉴定

将测序正确的 T-Bra 和 pPIC9K 同时进行双酶切, 纯化回收的 *des*-pGlu1-Brazzein 基因片段与 pPIC9K 连接, 构建重组载体 pPIC9K-Bra。以重组载体为模板, 以 AOX₁ 和 AOX₁' 为上下游引物进行 PCR, 扩增出了目的 DNA 片段, 结果如图 2A 所示。图中显示, 阴性对照没有扩增出任何片段, 空载的质粒 pPIC9K 扩增出一条约 500 bp 的条带, 此为 AOX₁ 基因片段 (494 bp), pPIC9K-Bra 扩增出一条约 700 bp 的目的条带, 此为 AOX₁ 基因片段 (494 bp) 加上 Bra 基因 (180 bp)。用 *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切 pPIC9K-Bra 的结果如图 2B 所示, 箭头所示为目的条带。质粒的测序检测结果也表明, 插入的基因与所设计的目的基因完全一致。

2.3 GS115-pPIC9K-Bra 酵母工程菌株的筛选和鉴定

2.3.1 抗性筛选

将测序正确的 pPIC9K-Bra 载体用 *Sal* I 进行单酶切并经纯化回收后, 电击转化感受态酵母细胞 GS115, 涂布于 MD 培养基上。

在 MD 培养基上生长的菌落经过 96 孔板的 3 次转接培养后, 将每孔细胞分别点种于 MM、MD 培养基及含不同浓度 G418 的 YEPD 培养基上培养。筛选到的工程菌株在 MM 和 MD 的培养基上均可以生长, 证明其表型为 Mut⁺; 筛选到的工程菌株在含 0.25 g/L 和 0.5 g/L 的 G418 平板上都可以生长, 在含 1 g/L 的 G418 的平板上有 50 多个菌株生长。1.5 g/L 时仅 4 株菌生长。而对照菌株 GS115 在 G418 为 0.25 g/L 时就不能生长。

2.3.2 PCR 检测

以筛选到高 G418 抗性的重组子菌落为模板, 以 AOX₁ 和 AOX₁' 为上下游引物进行 PCR, 结果如图 3 所示。阴性对照未扩增出任何片段, 阳性菌落对照扩增出了一条约 2 200 bp 的片段, 此为 AOX₁ 基因。以 *Sal* I 酶切线性转化的菌落扩增出两条带, 一条为 AOX₁ 基因 (Mut⁺), 一条为目的片段, 箭头所示。但第 6、9 泳道无目的片段, 为假阳性。共得到了 30 多个整合子。

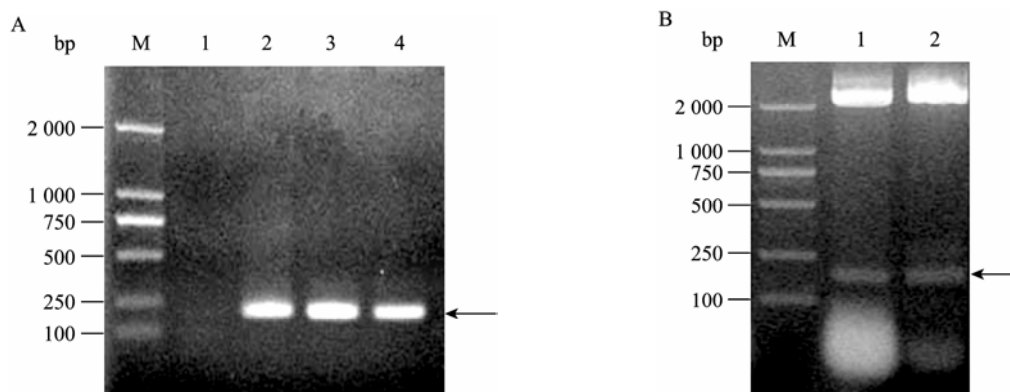


图 1 T-Bra 的 PCR 和酶切鉴定

Fig. 1 Identification of T-Bra by PCR (A) and enzyme digestion (B). (A) M: DNA marker; 1: control; 2-4: PCR product from T-Bra. (B) M: DNA marker; 1-2: T-Bra digested with *Eco*R I and *Not* I.

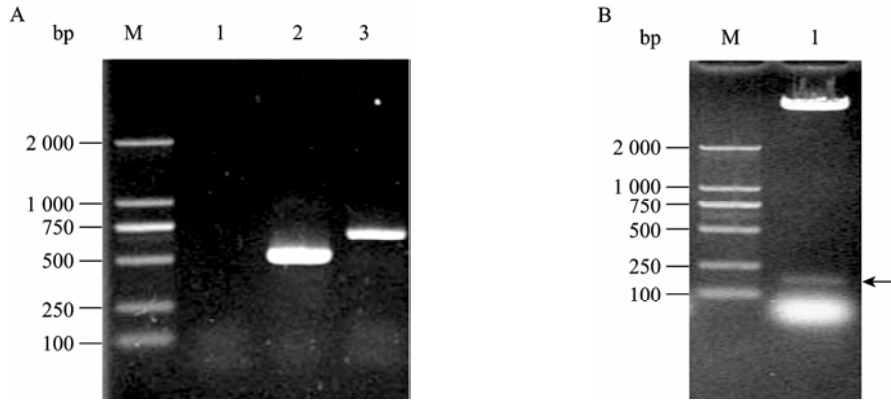


图2 pPIC9K-*Bra* 的 PCR 和酶切鉴定

Fig. 2 Identification of pPIC9K-*Bra* by PCR (A) and enzyme digestion (B). (A) M: DNA marker; 1: control; 2: PCR product from pPIC9K; 3: PCR product from pPIC9K-*Bra*. (B) M: DNA marker; 1: pPIC9K-*Bra* digested with *EcoRI* and *NotI*.

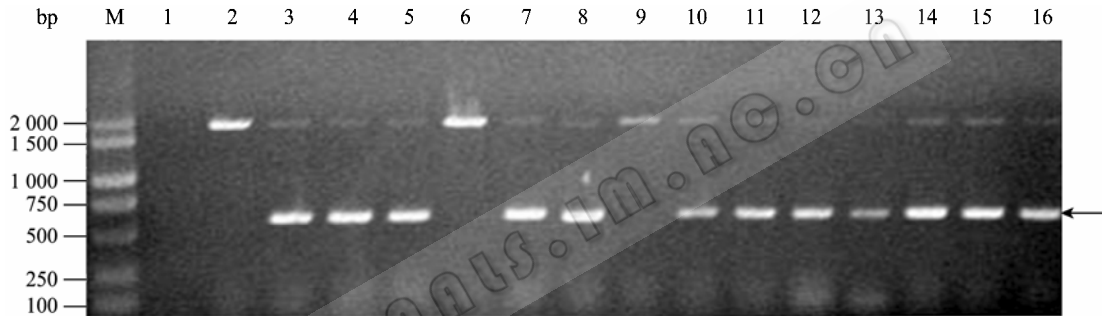


图3 重组酵母的菌落 PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant yeast by strain PCR. M: DNA marker; 1: control; 2: PCR product from GS115-pPIC9K; 3-16: PCR product from GS115-pPIC9K-*Bra*.

2.4 GS115-pPIC9K-*Bra* 的诱导表达

从高抗 G418 平板上挑取的菌落, 经 PCR 检测后进行甲醇诱导, 每隔 24 h 补加甲醇至 0.5%。诱导表达 6 d, 取上清液进行 SDS-PAGE 电泳验证结果如图 4 所示。图 4 显示 GS115-pPIC9K-*Bra* 比对照多表达了一条约 9 kDa 的目的蛋白, 箭头所示。表达量约占上清总蛋白的 51.6%。

2.5 *des*-pGlu1-Brazzein 的纯化和活性分析

将获得的分泌表达的上清液用透析袋透析后, 80 °C 加热 30 min, 离心以获得小分子量的 *des*-pGlu1-Brazzein, SDS-PAGE 检测纯化的情况如图 4 所示, 从图中可以看到, 目的蛋白得到了纯化。通过品尝的方法检测, 表达的 *des*-pGlu1-Brazzein 有一定的甜度, 约为蔗糖甜度的 200 倍。

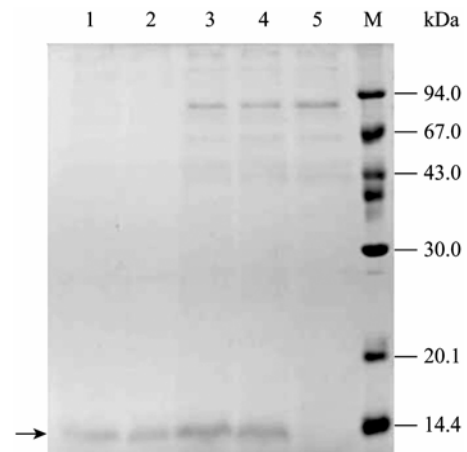


图4 表达和纯化产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of expressed and purified *des*-pGlu1-Brazzein. 1-2: purified target protein; 3-4: the supernatant of GS115-pPIC9K-*Bra* after induction; 5: the supernatant GS115-pPIC9K after induction; M: protein marker.

3 讨论

des-pGlu1-Brazzein 是目前为止所发现的甜度最高的蛋白, 是一种理想的蔗糖替代品, 可以满足肥胖症、糖尿病等患者对甜味的需求。但是该蛋白天然资源有限, 因此, 研究利用基因工程的方法生产该蛋白具有重要意义。基于大肠杆菌等原核生物表达系统的缺点, 本研究采用毕赤酵母 *Pichia pastoris* 表达系统表达该蛋白, 该系统具有显著的优点: 酵母能高密度连续培养; 外源基因整合到酵母染色体中能稳定遗传, 不易丢失; 具有强启动子可诱导高效表达; 表达的蛋白分泌到胞外, 易于纯化; 具有真核蛋白所具有的后加工过程, 尤其是糖基化修饰等; 已有多种蛋白在该系统成功表达^[10-11]。

我们按照酵母密码子的偏爱性优化了植物甜蛋白中 *des-pGlu1-Brazzein* 的密码子, 构建了适合在甲醇酵母中组表达的载体, 并成功实现了 *des-pGlu1-Brazzein* 在甲醇酵母中的表达。所表达的甜蛋白分泌到上清中, 约占上清蛋白的 51.6% 左右, 其他杂蛋白相对较少, 基于以前研究的结果, *des-pGlu1-Brazzein* 耐热, 所以在纯化分离时我们采用热处理的方法纯化目的蛋白, 这种方法简便快捷, 纯化效果好, 很适合大规模纯化。

表达的目的蛋白的分子量约为 9 kDa, 比预计的分子量大。这可能是由于所表达的肽链上的某些氨基酸残基被糖基修饰^[11]。我们采用生物软件分析表达的蛋白上有一些 O-糖基修饰位点, 这还有待于进一步证实。

所表达的目的蛋白纯化后经多人品尝, 具有一定的甜度, 约为蔗糖甜度的 200 倍, 比报道的甜度低, 其原因可能与其分子量增加有关, 导致其空间结构发生变化; 这可能与品尝的测定的方式具有较大的主观性有关, 导致测定结果可能有较大的误差, 还需要进一步分析。

REFERENCES

[1] Ming D, Hellekant G. Brazzein, a new high-potency

thermostable sweet protein from *Pentadiplandra brazzeana* B. FEBS Lett, 1994, 355(1): 106-108.

- [2] Faus I. Recent developments in the characterization and biotechnological production of sweet-tasting proteins. Appl Microbiol Biotechnol, 2000, 53(2): 145-151.
- [3] Assadi-porter FM, Aceti DJ, Cheng H, et al. Efficient production of recombinant brazzein, a small, heat-stable, sweet-tasting protein of plant origin. Arch Biochem Biophys, 2000, 376(2): 252-258.
- [4] Assadi-porter FM, Patry M, Markley JL, et al. Efficient and rapid protein expression and purification of small high disulfide containing sweet protein brazzein in *E. coli*. Protein Expr Purif, 2008, 58(2): 263-268.
- [5] Berlec A, Strukelj B. Large increase in brazzein expression achieved by changing the plasmid/strain combination of the NICE system in *Lactococcus lactis*. Lett Appl Microbiol, 2009, 48(6): 750-755
- [6] Li CL, He GQ, Ruan H, et al. Synthesis of the bacterial-like plant *des-pGlu1-Bra* gene and its recombinant expression in *Escherichia coli*. J Agr Biotech, 2005, 13(1): 38-41.
- 李春丽, 何国庆, 阮晖, 等. *des-pGlu1-Bra* 基因的人工合成及其在大肠杆菌中的重组表达. 农业生物技术学报, 2005, 13(1): 38-41.
- [7] Li CL, Chen QX, He GQ, The influences of lactose as an inducer on expression of plant *des-pGlu1-Brazzein* in *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2006, 22(6): 1021-1025.
- 李春丽, 陈其新, 何国庆. 乳糖诱导植物甜蛋白 *des-pGlu1-Brazzein* 在大肠杆菌中的表达. 生物工程学报, 2006, 22(6): 1021-1025.
- [8] Assadi-porter FM, Aceti DJ, Markley JL. Sweetness determinant sites of brazzein, a small, heat-stable, sweet-tasting protein. Arch Biochem Biophys, 2000, 376(2): 259-265.
- [9] Andersson SG, Kurland CG. Codon preferences in free-living microorganisms. Microbiol Rev, 1990, 54(2): 198-210.
- [10] Romanos M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. Curr Opin Biotech, 1995, 6(5): 527-533.
- [11] Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiol Rev, 2000, 24(1): 45-66.