

## 人工合成的单链甜蛋白 monellin 基因在大肠杆菌中的高效表达

陈忠军 路福平 蔡 恒 杜连祥

(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)

**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 3 000 倍。

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

Monellin 是存在于非洲植物 *Dioscoreophyllum cumminsii* 中的一种甜蛋白, 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。它的甜度是蔗糖的 3 000 倍, 热量低, 适于糖尿病、心血管病患者食用<sup>[1-4]</sup>。人们在 20 世纪 80 年代就开始了基因工程表达 monellin 的研究<sup>[5]</sup>。

天然的 monellin 由 2 条肽链组成(其中 A 链 44 个氨基酸, B 链 50 个氨基酸), 这 2 条肽链的耐热性和耐酸性较差, 不太稳定, 因此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 2 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<sup>[6]</sup>。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<sup>[7]</sup>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。经克隆、表达载体的构建, 成功地实现了具有特殊风味的 monellin 甜蛋白在大肠杆菌中的高效表达。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 菌株和质粒

表达质粒 pET-22b, 大肠杆菌菌株 BL21(DE3) 购自博大公司。

#### 1.1.2 工具酶和试剂

各种限制性内切酶、T4DNA 连接酶、TaqDNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司, Protein Marker、核酸分子量

标准、氨苄青霉素、IPTG 均购自上海 Sangon 公司; 所用试剂盒购自 Promega 公司。

#### 1.1.3 培养基及培养条件

LB 液体培养基用于细菌培养, 在 LB 培养基中添加质量分数 1.5% 的琼脂粉即为 LA 培养基, LB 培养基在用于抗性筛选时加入氨苄青霉素 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 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, 设计寡核苷酸片断 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 BamHI、NcoI 和 EcoRI, 以重组 PCR 合成完整的单链 monellin 基因。

F1 5'-ATGGGCGAATGGGAAATCATCGACATCGGTC-CGTTACCCAGAACCTGGGTAAGTTCGCTGTTGACG-3'

R1 5'-TCGTAGATGGTCTTTTCATGCACGGACGGATAACCTGTGTAAGGTCAGACGACCGTACTGGCCGATT-TGTTTTCTTCGTCAACAGCGAACTTACC-3'

F2 5'-ATGAAAAAGACCATCTACGAAGAAAACGG-TTCCGTGAAATCAAGGGTTACGAATACCAGCTGTACG-TTTACGCTCCGACAAGCTGTTC  
CGTGCTGACATCTCCGAAG-3'

R2 5'-TTACGGCGGGCGAACCAGCGGTTGAAACG-CAGCAGCTTACGACCACGGGTCTTGTAGTCTTCGGAGATGTCAGCACG-3'

(其中下划线分别代表了核苷酸片断的重叠部分)

上游引物 P1: 5'-CGGGATCCATGGCGAATGGGAAATCATCG-3'

BamHI NcoI

下游引物 P2: 5'-CGGAATCTTACGGCGCGGAACCG-3'

EcoRI

### 1.2.2 Monellin 基因的克隆及表达载体的构建

第一作者: 博士研究生, 副教授。

收稿日期: 2005-03-23, 改回日期: 2005-07-04

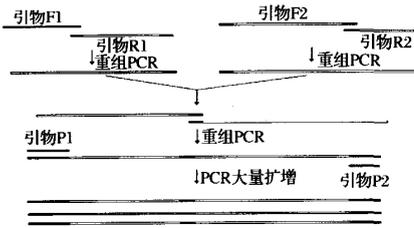


图1 monellin 基因 PCR 合成示意图

PCR 产物经 1.2% 琼脂糖电泳分离,并割胶回收纯化后,NcoI 和 EcoRI 双酶切 PCR 产物及表达质粒 pET-22b,以 T4 DNA Ligase 连接片断构建成重组表达质粒 pETMO。转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,在含有 100g/mL Amp 的 LA 培养基平板上挑取单克隆在 5 mL LB 培养基中培养,少量制备质粒 DNA,酶切验证后送大连宝生物公司测序。所用分子克隆技术参照文献[8]进行。

1.2.3 Monellin 的诱导表达及电泳检测

阳性转化子用 IPTG 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[9]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℃ 水浴 10 min,再用 0.2mol/L 的乙酸钠调节 pH 为 4.5,4℃ 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 Sephadex CM-50 柱。用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测提纯效果。

1.2.5 Monellin 的甜度测定

取一定量的纯化 monellin 溶于无离子水中,并稀释成不同浓度梯度。取 1 mL monellin 溶液与同体积 2% (W/V) 蔗糖溶液比较甜度。通过计算获得 monellin 的甜度值。

2 结果和讨论

2.1 重组质粒的构建及转化

利用所合成的 F1、R1、F2、R2 四条寡核苷酸片断以及 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 EcoRI 和 NcoI 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。

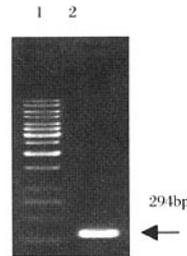


图2 monellin 基因的 PCR 产物

2.2 重组质粒及转化子的鉴定分析

培养阳性转化子并提取质粒,双酶切后进行琼脂糖电泳分析(图 3),发现重组质粒经双酶切后释出一条与 PCR 扩增片段大小一致的片段,同时在 5.5 kb 处存在的一条片段与线性的 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 294 bp,与预期大小相同。结果见图 4。

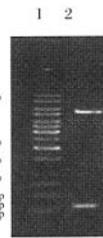


图3 质组质粒的酶切分析图

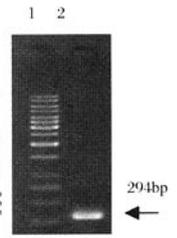


图4 重组质粒的 PCR 分析图

2.3 Monellin 的测序结果

图 5 为 monellin 基因核酸序列测序图。从测序结果可看出,重组质粒 pETMO 中的 monellin 基因序列与设计完全吻合。

```

M G E W E I D I G P F T Q N
1 ATG GGC GAA TGG GAA ATC ATC GAC ATC GGT CCG TTC ACC CAG AAC
L G K F A V D E E N K I G Q Y
46 CTG GGT AAG TTC GCT GTT GAC GAA GAA AAC AAA ATC GGC CAG TAC
G R L T F N K V I R P C W K K
91 GCT CGT CTG ACC TTC AAC AAG GTT ATC CGT CCG TGC ATG AAA AAG
T I Y E E N G F R E I K G Y E
136 ACC ATC TAC GAA GAA AAC GGT TTC CGT GAA ATC AAG GGT TAC GAA
Y Q L Y V Y A S D K L F R A D
181 TAC CAG CTG TAC GTT TAC GCT TCC GAC AAG CTG TTC CGT GCT GAC
I S E D Y K T R G R K L L R F
226 ATC TCC GAA GAC TAC AAG ACC CGT GGT CGT AAG CTG CTG CTT
N C P V P P *
271 AAC GGT CCG GTT CCG CCG CCG TAA
    
```

图5 monellin 基因测序图

2.4 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 11 ku 的蛋白带, 如图 6 所示, 与文献报道相同<sup>[1]</sup>。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 11Ku(见图 6)。

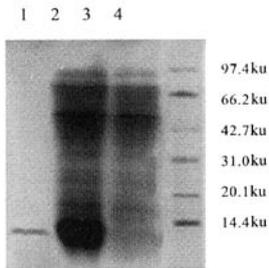


图 6 pETMO 在 *E. coli* BL21 (DE3) 中的表达及产物纯化的 SDS-PAE 电泳分析

## 2.5 纯化产物的甜度检测

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 3 000 倍。

## 3 讨论

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<sup>[10]</sup>。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。在本试验条件下, 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。

本研究利用合成的单链 Monellin 的热稳性及耐酸性较强的性质, 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, 此时上清液中的其他蛋白已变性沉淀, 而 monellin 仍很稳定, 从而将其进行提取纯化。

## 参 考 文 献

- 1 崔洪志, 李 敏, 郭三堆. 植物甜蛋白的研究进展[J]. 生物技术通报, 1997, (2): 10~13
- 2 范长胜. 甜蛋白的开发与应用研究[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(12): 50~54
- 3 洪 薇, 曹家树, 刘小杰. 甜蛋白的特性及其生物法生产[J]. 食品科学, 2002, 23(7): 144~147
- 4 钦传光, 丁 焰, 汤国龙. 新型非糖甜味剂研究进展[J]. 化学世界, 1998, 8: 399~402
- 5 范长胜, 陈永青, 李 爽, 等. 超甜蛋白的基因工程及开发研究进展[J]. 工业微生物, 1999, 29(1): 29~33
- 6 Kim S H, Kang C H, Kim R, et al. Redesigning a sweet protein: increased stability and renaturability[J]. Protein Engineering, 1989, 2(8): 571~579
- 7 Penarrubin L, Kim R, Giovannoni J, et al. Production of the sweet protein monellin in transgenic plant[J]. Bio/Technology, 1992, 10: 561~564
- 8 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (著). 金冬雁, 黎孟枫 (译). 分子克隆指南(第 2 版)[M]. 北京: 科学出版社, 1995. 11~34
- 9 汪家政, 范 明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 77~97
- 10 广 超, 胡美浩. 影响大肠杆菌中外源基因表达的因素[J]. 生物化学与生物物理进展, 1994, 21(2): 128~132

## High-level Expression of A Sweet Protein, Single-chain Monellin, in *E. coli*

Chen Zhongjun Lu Fuping Cai Heng Du Lianxiang

(Tianjin key lab of industrial microbiology, The College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin, 300222, China)

**ABSTRACT** According to the amino acid sequence of monellin, a single chain 294bp monellin gene was synthesized based on *E. coli* biased codons. The fragment was inserted into vector pET-22b to construct the recombinant secretory plasmid pETMO. Induced by IPTG, monellin could be produced at a high level in *E. coli* BL21 (DE3), accounts for 44.8% of the soluble protein. The *E. coli* expressed single-chain monellin was 3000 times sweeter than sucrose.

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