

利用毕赤酵母表达植物甜蛋白(brazzein)的初步研究

赵红玲 陈劲春*

(北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029)

摘要: 实验将含有 Brazzein 基因的 pPIC9 K 穿梭质粒通过电导入巴斯德比赤酵母 (*Pichia pastoris*) GS115 中, 并从 22 个阳性克隆中筛选出 His⁺ Mut^s 高拷贝转化子 2 个, 经诱导表达, 产物进行 Tricine-SDS-PAGE 电泳鉴定, 目标蛋白的相对分子量与理论值一致, 又经小试 (5~10 L 罐) 蛋白产量可达 385 mg/L。利用大孔树脂 D152 初步分离, 得到有微甜味的产物。进一步纯化后获得了 ¹D-NMR 图谱。

关键词: 甜蛋白; 大孔吸附树脂; 毕赤酵母

中图分类号: Q786

Brazzein 是由 D. Ming 等 1994 年从非洲植物 *Pentadiplandra brazzeana* 果实中分离得到的, 取名于该植物的种名。甜度为蔗糖的 2000 倍, 稳定性好, 80 °C 加热 4 h 不破坏, 98 °C 2 h 不失去甜味^[1]。它有三种分子结构, 其中一种含有 54 个氨基酸残基, 相对分子质量为 6473, 活性形式为单体。Hellekant 等 1994 年用大肠杆菌表达 Brazzein, Tomes 1997 年应用于转基因植物获得成功^[1]。目前尚无正式文献报道采用毕赤酵母表达该蛋白, 本实验室选用适合外源蛋白分泌表达的巴斯德比赤酵母 (*Pichia pastoris*) 作为表达宿主。用毕赤酵母表达该蛋白的优势在于: 与大肠杆菌相比, 可以进行高密度发酵, 表达的产量高, 后分离纯化也相对容易; 与转基因植物相比表达无时间空间限制。

1 材料

1.1 菌种和质粒

P. pastoris GS115 和 pPIC9 K 购自 Invitrogen 公司, 目的基因由本实验室设计并构建成表达载体。大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109 来源于中国科学院遗传所。

1.2 其它材料

限制性内切酶 Bgl I 购自 Takara 公司, 氨基青霉素 (AMP) 和 G418 购自华美公司。

1.3 培养基

大肠杆菌培养基 2 × YT: 质量分数 1.6% 蛋白胨, 1.0% 酵母提取物, 1.0% NaCl, pH 值 7.0; 酵母培养基 YPD, 1.0% 酵母提取物, 2.0% 蛋白胨, 2.0% D-葡萄糖; 筛选平板 MD: 1.34% YNB (yeast nitrogen base), 1.0% D-葡萄糖, 生物素, 1.5% 琼脂粉; 筛选平板 MM: 1.34% YNB, 0.5% 甲醇, 生物素, 1.5% 琼脂粉; 重组酵母生长培养基 BMGY: 1.34% YNB, 2% 蛋白胨, 1.0% 酵母提取物, 1.0% 甘油, 0.1 mol/L pH6.0 磷酸钾缓冲液; 酵母诱导培养基 BMMY: 1.34% YNB, 0.5% 甲醇, 2.0% 蛋白胨, 1.0% 酵母提取物, 0.1 mol/L pH 值 6.0 磷酸钾缓冲液。

小试基础盐培养基 BSM 的主要成分: 硫酸钙质量浓度 0.93 g/L, 硫酸钾 18.2 g/L, 七水硫酸镁 14.9 g/L, 甘油 40 g/L, 硫酸铵 10 g/L, 0.1 mol/L 的 pH 值 6.0 磷酸钾缓冲液。PTM1 微量元素的主要成分: 五水硫酸铜 6.0 g/L, 碘化钠 0.08 g/L, 一水硫酸锰 3.0 g/L, 二水钼酸钠 0.2 g/L, 硼酸 0.02 g/L, 氯化钴 0.5 g/L, 氯化锌 20.0 g/L, 七水硫酸亚铁 65.0 g/L, 生物素 0.2 g/L, 硫酸 5.0 mL/L。培养基试剂均为进口分析纯及生化试剂。

2 实验与结果

2.1 质粒的提取和电转化

将 *E. coli* 接种在含有 AMP 的培养基 2 × YT 中, 37 °C 培养过夜, 5000 r/min × 5 min 收集菌体, 按有机溶剂法提取质粒^[2]。取适量质粒和限制性内切酶 Bgl I 混匀, 37 °C 酶切 2 h, 再用 0.7% 琼脂糖凝

收稿日期: 2004-04-02

第一作者: 女, 1977 年生, 硕士生

*通讯联系人

E-mail: chocolatezh@eyou.com

胶电泳鉴定。将已线性化的质粒和感受态 GS115 按 Invitrogen 操作指南进行电转化。

2.2 His⁺ Mut^s 转化子和高拷贝转化子的筛选^[3]

GS115 是组氨酸的缺陷型, pPIC9K 穿梭质粒线性化后与感受态宿主染色体上的 AOX₁ 基因同源重组, 宿主 AOX₁ 被取代, 由于 pPIC9K 含有一个 His 基因和一个卡那霉素的抗性基因, 其转染的宿主菌能够耐受 G418, 转入外源基因的拷贝数越多, 宿主耐受 G418 的量就越高, 所以转化后的阳性克隆可以在 MD 平板和含有不同浓度 G418 的 YPD 平板上生长, 在以甲醇为唯一碳源的 MM 平板上则生长缓慢(如图 1), 以此作为筛选标志, 将电转化后在 MD 平板上生长的 His⁺ 的克隆同时点接在 MM, MD 平板上, 30 ℃ 培养 3~6 d, 观察 MD 平板上生长明显快于 MM 平板的即为 His⁺ Mut^s 转化子, 再将 His⁺ Mut^s 转化子点接在分别含 0.25 mg/mL, 0.50 mg/mL, 0.75 mg/mL, 1 mg/mL G418 的 YPD 平板上, 30 ℃ 培养一周, 可筛选出耐受 G418 的高拷贝转化子。本实验获得 22 个重组阳性克隆和 2 个高拷贝菌株。

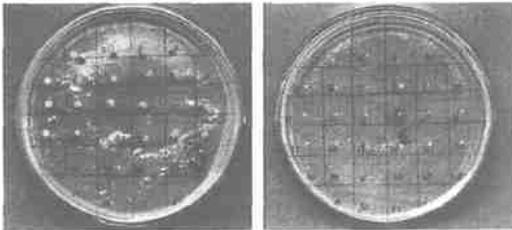
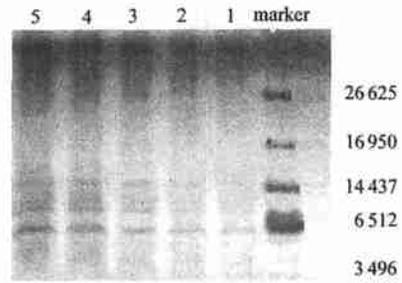


图 1 重组子 MD, MM 平板上的对照

Fig. 1 Growth comparison of recombinants on MD and MM plates

2.3 Brazzein 的诱导表达

在筛选的阳性克隆中选取高拷贝菌株进行诱导培养, 30 ℃ 培养至吸光度 $A_{600} = 2 \sim 4$ 时, 按 10% 接种量接入 BMGY 培养基中, 30 ℃ 培养 24 h, 室温 5000 r/min × 5 min 离心, 收集菌体, 无菌水洗涤菌体两次, 重悬于等体积的 BMMY 培养基中, 28 ℃, 每隔 24 h 加入 0.5% 的诱导剂-甲醇, 诱导表达 5 d。室温 12000 r/min × 5 min 离心, 离心上清进行 Tricine-SDS-PAGE 分析^[2], 如图 2 所示, 经凝胶成像系统分析目标蛋白的相对分子质量 6400 与理论设计吻合, 也符合表达量随着诱导时间延长而逐渐增大的表达模式, 随着蛋白质浓度的提高出现部分聚合形成二聚体。



1~5 分别为诱导表达 24, 48, 72, 96, 120 h

图 2 蛋白表达的 SDS-PAGE 电泳

Fig. 2 SDS-PAGE electrophoresis result of expressed proteins

2.4 Brazzein 的小试发酵

采用 10L 的发酵罐进行小试。种子培养基采用 YPD, 发酵培养基采用 BSM (4 mL/L 的 PTM₁)。首先将 50 μL 甘油菌接种到 5 mL YPD 中, 30 ℃、200 r/min 培养过夜。转接到 500 mL 的 YPD 中, 培养至吸光度 $A_{600} = 50 \sim 60$ 。接入 4.5 L 的 BSM 培养基中, 发酵罐的控制参数为: (1) 生长期温度 30 ℃, 转速 500 r/min, pH 值 5.3, 溶氧 30% 以上; (2) 诱导期温度 28 ℃, 转速 500 r/min, pH 值 5.8, 溶氧 30% 以上。采用乙二醇法测定甘油含量^[5]。当 A_{600} 达到 100 左右开始诱导。用 25% 的氨水维持 pH 值, 采用油酸作消泡剂, 用量为体积分数 0.05%。从接种开始每隔 4 h 取样测定生长阶段的生长曲线, 由图 3 可知前 40 h, 培养基营养丰富, 供氧充足, 重组菌生长处于指数期, 生长迅速; 40 h 后, 菌体生长缓慢, 逐步进入衰亡期, 所以在 40 h 开始诱导。诱导开始后每隔 24 h 测定吸光度 (A_{600}) 和蛋白质量浓度(如图 4)。96 h 蛋白质量浓度增幅开始减小, 所以停止发酵。发酵上清用 Coomassie blue 蛋白染色方法测定蛋白质质量浓度^[4]为 385 mg/L, 经凝胶分析测试系统分析目标蛋白的可达 50%。

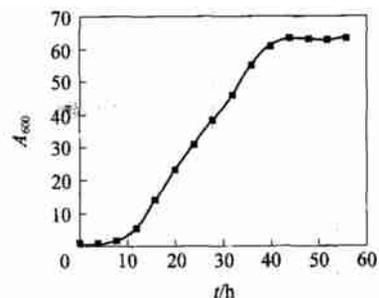


图 3 毕赤酵母的生长曲线

Fig. 3 Growing curve of *Pichia pastoris*

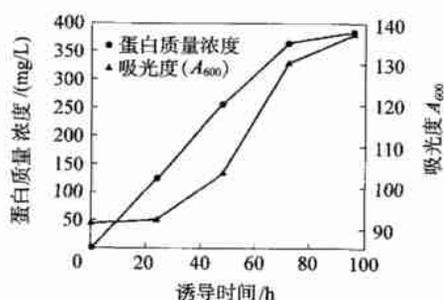
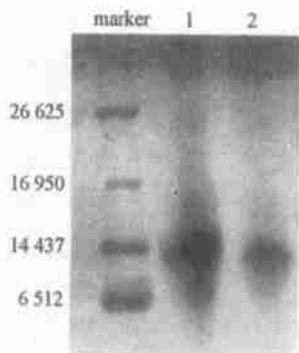


图 4 蛋白质量浓度和吸光度随诱导时间的变化

Fig. 4 Increase of expression product and cell density with induction time

2.5 表达产物初步分离

重组菌培养至最佳时间后,5 000 r/min ×5 min 离心收集发酵液上清。利用大孔弱酸阳离子交换树脂 D152 进行目标蛋白的吸附,0.01 mol/L pH 值 5.4 的 NaAc-HAc 解析液进行解析,解析液用截流相对分子质量为 3 000 的超滤膜超滤浓缩,浓缩液中加入 4 倍体积的冷丙酮沉淀目标蛋白,沉淀物在 40 °C 下真空干燥后,溶解于 0.1 mol/L 的盐酸;另取发酵上清在等电点下沉淀得到蛋白样品,将二者一起进行 SDS-PAGE 鉴定(如图 5)。由图可见,SDS-PAGE 电泳无杂带,大孔吸附树脂 D152 专一的吸附了发酵上清目标蛋白。但是由于在解吸液中目标蛋白浓度较高条件下发生单体聚合,相对分子质量增加了一倍,所以凝胶分析结果显示相对分子质量为 13 000 左右,可见 D152 达到初步分离效果。



1. D152 树脂吸附 2. 等电点沉淀

图 5 树脂吸附与等电点沉淀的 SDS-PAGE 电泳

Fig. 5 Comparison of resin adsorption and pI precipitation on SDS-PAGE

2.6 表达产物的鉴定

将经树脂吸附解析的蛋白透析脱盐,浓缩,干燥。取少量固体溶于去离子水中,口试有微甜味。将树脂解析液经 Sephadex G-50 凝胶柱脱盐,收集

目标相对分子质量的蛋白,对收集液用 4 倍冷丙酮沉淀,得到的白色絮状沉淀在 40 °C 下真空干燥后,在²H₂O 与¹H₂O 的体积比为 1:9 和 pH 值 5.2 ~ 5.4,22 °C 的条件下,得到 600 MHz ¹H-NMR 核磁共振谱图(见图 6)。与文献[5]报道的从植物中提取的 Brazzein 同条件下核磁共振谱图比较,主要官能团的化学位移基本一致,由于样品纯度不高以后还需要作进一步的纯化研究。

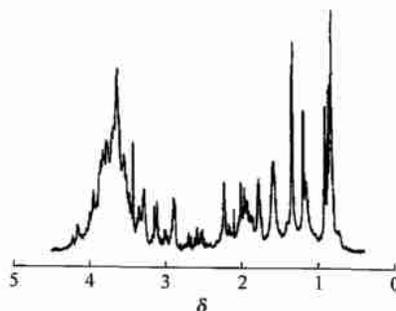


图 6 Brazzein 纯化样品的¹H-NMR 图谱

Fig. 6 ¹H-NMR spectrum of the purified Brazzein sample

3 讨论

毕赤酵母表达系统具有产物稳定的独特优势,因为是将基因整合到宿主染色体上,检测连续继代 8 次,外源基因缺失率为 0。与植物提取法相比较原料无毒害,更适用于食品行业。本实验室还将在提高产量和进一步的分离纯化上作深入研究。

参 考 文 献

- [1] 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
- [2] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 J. 分子克隆实验指南[M]. 第二版. 金冬燕, 黎孟枫译. 北京: 科学出版社, 1987
- [3] 闫亚军, 陈劲春. 利用转基因毕赤酵母高表达小分子药用多肽的研究[J]. 北京化工大学学报, 2002, 29 (4): 1 - 3
- [4] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2002
- [5] Fariba M, David J. Efficient production of recombinant brazzein, a small, heat-stable, sweet-tasting protein of plant origin [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2000, 376 (2): 252 - 258

(下转第 20 页)

- cable compounding [J]. *Plastics Additives and Compounding*, 2002(12) :22
- [2] Ginter B. Nanocomposites: a new class of flame retardants for polymers[J]. *Plastics Additives and Compounding*, 2002(10) :22
- [3] Hippi U, Mattila J, Korhonen M, *et al.* Compatibilization of polyethylene/ aluminum hydroxide (PE/ATH) and polyethylene/ magnesium hydroxide (PE/MH) composites with functionalized polyethylenes [J]. *Polymer*, 2003, 44:1193 - 1201
- [4] 章正熙, 华幼卿, 陈建峰, 等. 纳米碳酸钙湿法表面改性的研究及其机理探讨[J]. *北京化工大学学报*, 2002, 29(3) :49
- [5] 曾人泉. 塑料加工助剂[M]. 北京:中国物质出版社, 1997, 820 - 824
- [6] 马志领, 高俊刚. 酸式磷酸酯在膨胀型阻燃聚丙烯中的偶联作用[J]. *中国塑料*, 2003, 17(3) :73

Dry-modification of nano-Al(OH)₃ and its application in EVA

ZHANG Xin-gui GUO Fen CHEN Jian-feng ZHANG Yun-liang CHEN Guo-shu

(Key Lab for Nanomaterials, Ministry of Education, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: By a dry modification of nano-Al(OH)₃ with titanate coupling agent, the best results were obtained: coupling agent dosage 0.5% (by weight), reaction time 25 min and temperature 100~110 °C. The surface characterization of the modified particles was investigated by means of FTIR and TEM, etc. IR analysis shows that the organic groups have attached to Al(OH)₃ surface by chemical bonds. TEM reveals that the agglomeration of the nano-particles weakens, the specific surface area of Al(OH)₃ enlarges. It is observed that the modified Al(OH)₃ has a better dispersion and adhesion to the EVA matrix than the unmodified Al(OH)₃, and the flame retardancy of Al(OH)₃ is improved while the mechanical properties of the composites could be remained.

Key words: nano-Al(OH)₃; dry surface-modification; titanate coupling agent; flame retardancy; mechanical properties

(责任编辑 云志学)

(上接第 16 页)

Secret expression of plant sweet-tasting protein brazzein in yeast *Pichia pastoris*

ZHAO Hong-ling CHEN Jin-chun

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: Brazzein is a natural sweet tasting protein firstly extracted from a high plant distributing in west Africa. Brazzein possesses potential commercial value due to its characterization of high sweetness and high heating stability. Some primary research results were obtained in our lab. A synthesis DNA fragment coding for brazzein was inserted into the plasmid pPIC9K to construct the expression vector pPIC9K-B which was transformed into the host cell yeast *Pichia pastoris* GS115 by means of eletroporation. By a series of screening 22 positive clones were identified. Among them 2 clones bear a high copy of the purpose gene. The behavior of the target protein on Tricine-SDS-PAGE was identifiable to its molecular weight 6473. Moreover, one clone was further investigated by fermentation in a small scale and its raw product with sweet taste was 385 mg/L.

Key words: brazzein; macro-porous resin; *Pichia pastoris*

(责任编辑 云志学)