

Brazzein 基因的合成及 pGAPZ A-Bra 表达载体的构建

王长远, 张丽萍*, 刘松财*, 汤丹

(1. 黑龙江八一农垦大学, 黑龙江大庆 163319; 2. 吉林大学畜牧兽医学院, 吉林长春 130062)

摘要 [目的] 为 Brazzein 基因在酵母 SMD1168 中转化和表达奠定基础。[方法] 利用重叠延伸 PCR(SOE PCR) 合成 Brazzein 基因, 将其连接到 pMD18-T 载体上, 构建克隆载体 pMD18-T-Bra。分别用 Xho I 和 Xba I 限制内切酶对克隆质粒 pMD18-T-Bra 和酵母表达载体 pGAPZ A 进行酶切, 并在 T₄ DNA 连接酶作用下, 将回收的目的基因连接到 pGAPZ A 载体上, 构建重组质粒 pGAPZ A-Bra。[结果] 通过 PCR 扩增获得了约 188 bp 的 Brazzein 类似物的编码序列, 将其克隆到 pMD18-T 质粒, 用 Xho I 和 Xba I 双酶切后, 连接到 pGAPZ A 载体, 成功构建了重组表达载体 pGAPZ A-Bra。Brazzein 基因其中各碱基未发生突变, 整个表达载体阅读框正确无误。[结论] 利用基因工程的方法生产 Brazzein 是可行的。

关键词 Brazzein; 克隆; pGAPZ A-Bra 表达载体

中图分类号 Q782 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)15-06230-03

Synthesis of Brazzein Gene and Construction of Expression Vector pGAPZ A-Bra

WANG Chang-yuan et al (Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing, Heilongjiang 163319)

Abstract [Objective] The research aimed to lay the foundation for the transformation and expression of Brazzein gene in yeast SMD1168. [Method] Brazzein gene was synthesized by using splicing overlap extension PCR (SOE PCR). It was connected with pMD18-T vector to construct cloning vector pMD18-T-Bra. Enzyme digestion with restriction endonuclease Xho I and Xba I was made on cloning vector pMD18-T-Bra and yeast expression vector pGAPZ A. Under the action of T₄ DNA ligase, the reclaimed target gene was connected with pGAPZ A vector to construct plasmid pGAPZ A-Bra. [Result] A coding sequence of Brazzein analog with the size of about 188 bp was obtained through PCR amplification. After it was cloned pMD18-T plasmid and digested with double enzymes Xho I and Xba I, it was connected with pGAPZ A vector. And the recombinant expression vector pGAPZ A-Bra was successfully constructed. No mutation was found in each base in Brazzein gene and the reading frame in the whole expression vector was exact. [Conclusion] It was feasible to produce Brazzein by the method of genetic engineering.

Key words Brazzein; Cloning; Expression vector pGAPZ A-Bra

Brazzein 是 1994 年 Ming 等从非洲西部野生植物果实中提取出的一种甜味蛋白, 由 54 个氨基酸组成, 分子量为 6.5 kD, 具有高甜度、耐高温、低热量、无副作用等特点, 因此, Brazzein 是一种理想的食品添加剂^[1]。由于生产 Brazzein 的植物离开了自然栖息地后难以成活, Brazzein 的开发受到资源、产地的限制, 而化学合成的 Brazzein 成本昂贵, 目前难以进行规模生产。随着生物技术的不断发展, 人们试图利用生物工程的方法来获得甜味蛋白, 并初步获得成功^[2]。选用适合外源蛋白分泌表达的毕赤酵母作为表达宿主, 用毕赤酵母表达该蛋白具有以下优势: 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。所以笔者利用重叠延伸 PCR 方法(SOE PCR) 合成 Brazzein 基因, 以构建 pGAPZ A-Bra 毕赤酵母表达载体, 为该基因进一步在酵母 SMD1168 中转化和表达提供基础, 预获得有生物活性的蛋白。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒。宿主菌 Electrocompetent *E. coli* TOP10F' (recA, endA)、毕赤氏酵母(*Pichia pastoris*) 菌株 SMD1168 (his4, pep4) pGAPZ A 表达载体购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 酶与试剂。实验中所用限制内切酶 Xba I、Xho I、T₄ DNA 连接酶、pfuDNA 合成酶、dNTPs、DNA Marker (DL2000, MARKER III) 均购自宝生物工程(大连)有限公司; DNA 胶回收试剂盒购自华舜生物工程公司; 丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、

蛋白胨(Peptone)、酵母提取物(Yeast extract) 购自 Bio Basic Inc. (Canada); Tris 碱、甘氨酸为 Amersco 分装; 常规生化试剂均为国产分析纯。引物由宝泰克公司合成; 基因测序由上海生工生物工程有限公司完成。

1.2 实验方法

1.2.1 目的基因的合成。据文献报道的 Brazzein 氨基酸序列^[3], 采用酵母偏爱的密码子^[4] 设其基因序列, 敲除氨基端第 1 个氨基酸, 29 位的天冬氨酸变为天冬氨酰, 41 位的 Gu (E) 变为 Lys (K), 并根据 pGAPZ A 多克隆位点的特点以及 Brazzein 基因酶切特性, 设计 4 对引物, 分别在正向引物引入 XbaI 酶切识别位点, 在反向引物引入 XhoI 酶切识别位点, 并采用 SOE PCR 法获得 Brazzein 基因(长度为 188 bp)。具体方法如下:

第 1 次 PCR, 10 × Buffer 1 μl, 引物 P2 \ P4 3 μl, 引物 P5 \ P7 3 μl, dNTP 2 μl, Taq E 1 μl, 总体积 10 μl。PCR 条件为 55 30 s, 72 5 min, 1 个循环。

第 2 次 PCR 是用第 1 次 PCR 的产物作模板, 10 × Buffer 1 μl, 引物 P1 \ P3 1 μl, 引物 P6 \ P8 1 μl, dNTP 2 μl, 模板 1 μl, Taq 酶 1 μl, ddH₂O 3 μl, 总体积为 10 μl。PCR 条件为 95 预变性 2 min, 95 30 s, 55 30 s, 72 1 min, 30 个循环, 72 延伸 10 min, 后 2 次 PCR 的模板均为前次 PCR 的产物, 反应条件同第 1 次 PCR。取最终 PCR 扩增产物, 2.5% 琼脂糖电泳 30 min, 紫外灯下观察扩增结果。

合成 4 对引物: P1, 5'-CTC GAG AAA AGA GAC AAG TGT AAG AAG GTT TAC GAG AAC TAC CCA-3'; P2, 5'-GTT TCT AAG TGT CAA TTG GCT AAC CAA TGT AAC TAC GAC TGT-3'; P3, 5'-AGC CAA TTG ACA CTT AGA AAC TGG GTA GTT CTC GTA AAC CTT-3'; P4, 5'-TCT AGC GTG CTT CTT CAA CTT ACA GTC GTA GTT ACA TTG GTT-3';

基金项目 黑龙江省自然基金项目(C200618); 黑龙江省农垦总局科技攻关项目(HNKXY-08-11A)。

作者简介 王长远(1976-), 男, 黑龙江大庆人, 硕士, 讲师, 从事微生物方面的教学和研究。* 通讯作者。

收稿日期 2008-03-26

ner ;P5,5 - AAG TTG AAG AAG CAC GCT AGA TCT GGT GAG TGT TTC TAC GAC-3 ,42 mer ;P6,5 - AAG AAG AGA AAC TTG CAA TGT ATT TGT GAC TAC TGT GAG TAC-3 ,42 mer ;P7,5 - ACA TTG CAA GTT TCT CTT CTT GTC GTA GAA ACA CTC ACC AGA-3 ,42 mer ;P8,5 - AGA TCT AGA TGG GAG TTA GTA CTC ACA GTA GTC ACA AAT-3 ,39 mer 。

1.2.2 目的基因的克隆及鉴定。通过重叠延伸PCR法获得Brazzein基因,将其连接到pMD18-T载体上,构建克隆载体pMD18-T Bra。取连接产物转化DH5感受态细胞,挑取阳性菌落扩大培养,提取重组质粒后进行PCR和Xho I/Xba I双酶切鉴定。将酶切与PCR鉴定正确的阳性质粒送TaKaRa公司进行核酸序列测定。

1.2.3 酵母表达载体pGAPZ A Bra的构建。

1.2.3.1 Brazzein基因和pGAPZ A表达载体的连接。将测序正确的克隆质粒pMD18-T Bra及酵母表达载体pGAPZ A分别用Xho I和Xba I限制性内切酶进行酶切,回收酶切片段,在T₄DNA连接酶作用下,将回收的目的基因连接到pGAPZ A载体上,构建重组质粒pGAPZ A Bra。

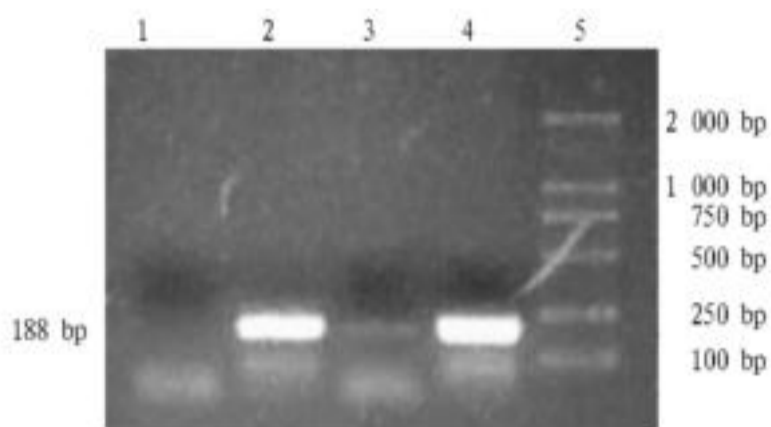
取连接产物转化E.coli Top 10 F感受态细胞,将转化产物涂布在含25 μg/ml Zeo⁺的低盐LB平板,37℃培养16 h,直至出现转化菌落。挑取阳性菌落扩大培养,提取重组质粒。

1.2.3.2 pGAPZ A Bra重组质粒鉴定。以重组质粒为模板,进行PCR扩增(P1、P8),反应条件同目的基因的合成条件,扩增产物在2.5%琼脂糖电泳;同时用Xho I和Xba I限制性酶酶切pGAPZ A Bra重组质粒,酶切产物经2.5%琼脂糖电泳;最后将酶切与PCR鉴定正确的阳性质粒送TaKaRa公司进行核酸序列测定。

2 结果与分析

2.1 甜味蛋白Brazzein基因的合成

2.1.1 PCR产物纯化回收结果。采用SOE PCR方法通过扩增获得了约188 bp的DNA基因片段,与理论设计目的片段大小相符(图1)。



注:1、3为阴性对照;2、4为PCR扩增产物;5为分子量标准(DL2000)。

Note:1,3.Negative control;2,4.PCR amplification products;5.Marker(DL2000)。

图1 PCR扩增的Brazzein基因电泳图谱

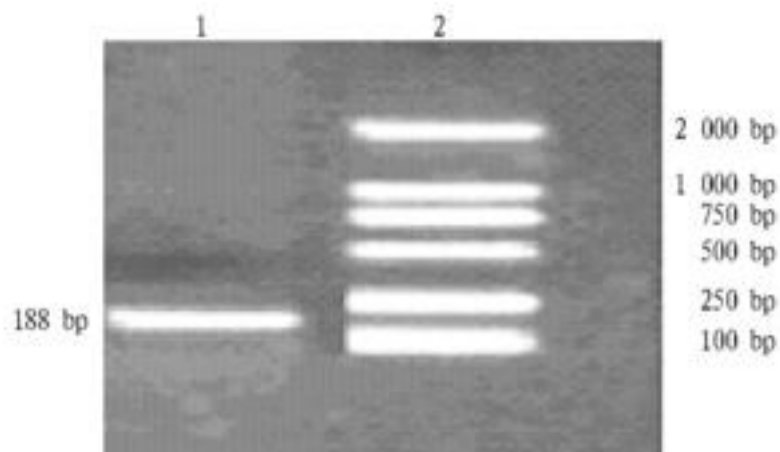
Fig.1 Electrophoresis of PCR amplified Brazzein gene

2.1.2 PCR产物酶切纯化结果。用Xba I、Xho I酶切PCR产物,回收并纯化酶切产物,2.5%琼脂糖电泳30 min,产物大小与理论值基本一致(图2)。

2.2 目的基因的克隆及鉴定

2.2.1 重组质粒pMD18-T Bra PCR鉴定结果。pMD18-T Bra

经PCR鉴定,电泳在188 bp有特异带出现,与理论值基本一致(图3)。

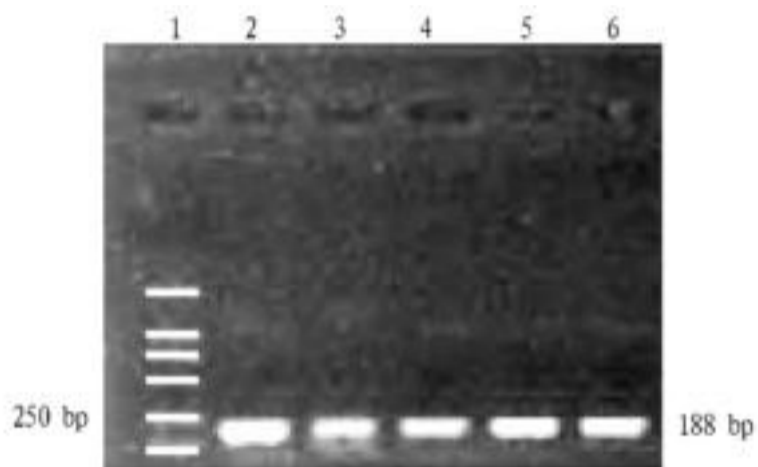


注:1为纯化的PCR产物;2为Marker(DL2000)。

Note:1.Purified PCR product;2.Marker(DL2000)。

图2 纯化的PCR产物电泳图谱

Fig.2 Electrophoresis of purified PCR products



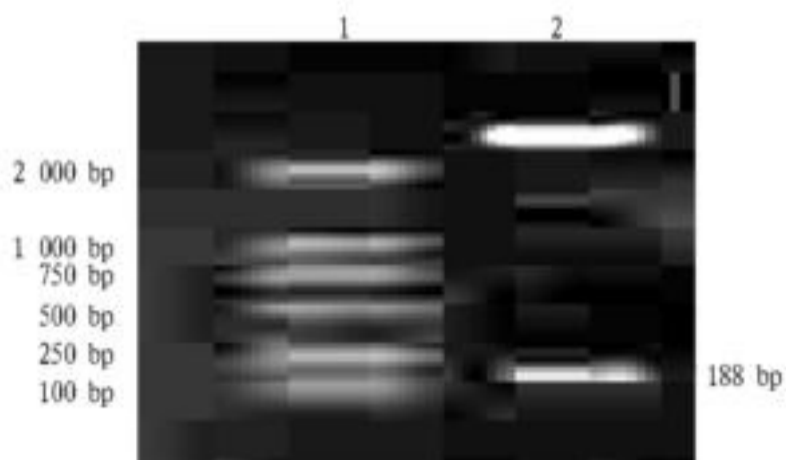
注:1为Marker DL2000;2-6为PCR产物。

Note:1.Marker DL2000;2-6.PCR products。

图3 重组质粒pMD18-T Bra PCR鉴定电泳

Fig.3 Electrophoresis of recombinant plasmid pMD18-T Bra by PCR amplification

2.2.2 重组质粒pMD18-T Bra酶切鉴定电泳结果。用Xba I、Xho I酶切重组质粒,2.5%琼脂糖电泳,重组质粒显示2条带,一条与180 bp相近,一条与pMD18-T质粒相近,分子量与理论基本一致(图4)。



注:1为Marker III;2为pMD18-T Bra(Xho I/Xba I)酶切。

Note:1.Marker III;2.pMD18-T Bra(Xho I/Xba I) restriction enzyme。

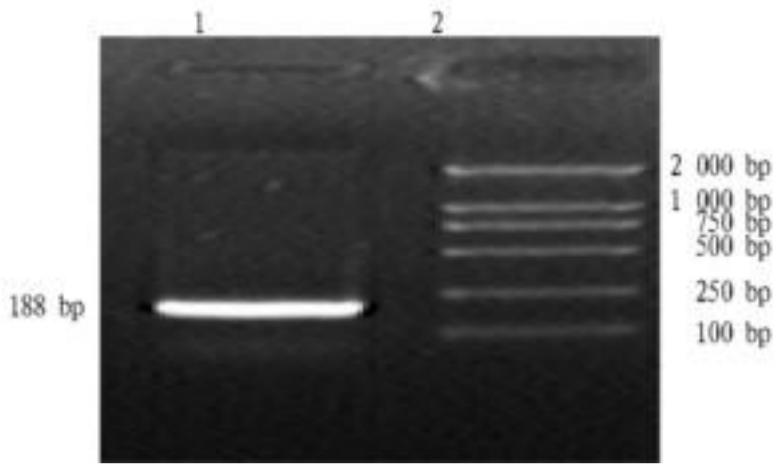
图4 重组质粒pMD18-T Bra酶切鉴定电泳图

Fig.4 Electrophoresis of recombinant plasmid pMD18-T Bra identification by restriction enzyme

通过PCR、酶切、序列测定(图略),证明已成功构建了pMD18-T Bra载体。

2.3 重组酵母表达质粒pGAPZ A Bra鉴定

2.3.1 PCR鉴定结果。扩增产物在2.5%琼脂糖电泳结果显示,在188 bp出现目的带,与预期片段大小相符(图5)。



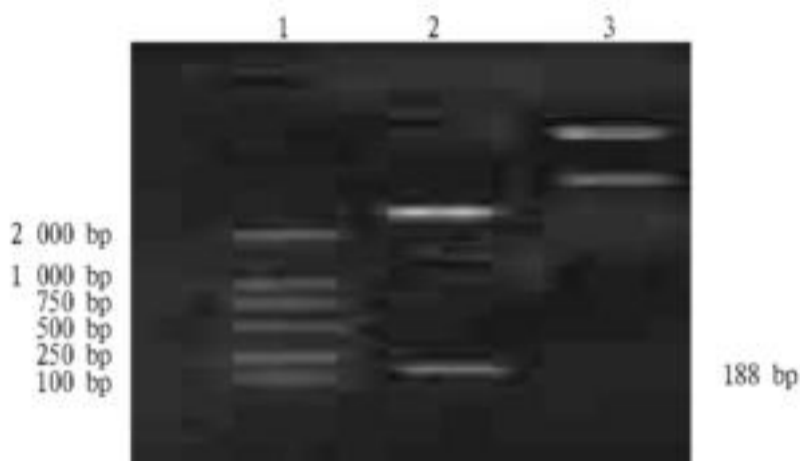
注:1 为 PCR 产物 (188 bp) ;2 为 Marker III。

Note:1 .PCR product (188 bp) ; 2 .Marker III .

图5 重组酵母表达质粒pGAPZ A Bra PCR 产物电泳图谱

Fig.5 Electrophoretogram of recombinant yeast expression plasmid pGAPZ A Bra by PCR amplification

2.3.2 限制性酶切结果。用 Xho I 和 Xba I 限制性酶切 pGAPZ A Bra 重组质粒,酶切产物在 2.5% 琼脂糖电泳(图 6),结果显示在 188 bp 处出现目的带,与预期片段大小相符。



注:1 为 Marker III ;2 为双酶切产物 (3 100 bp/188 bp) ;3 为 pGAPZ A Bra。

Note:1 .Marker III ; 2 .Products of double restriction endonuclease digestion ; 3 .pGAPZ A Bra .

图6 重组酵母表达质粒pGAPZ A Bra(Xho I/ Xba I) 酶切鉴定电泳

Fig.6 Electrophoretogram of recombinant yeast expression plasmid pGAPZ A Bra (Xho I/ Xba I) by restriction enzyme

2.3.3 pGAPZ A Bra 重组质粒进行序列测定。将酶切与 PCR 鉴定正确的阳性质粒送 TaKaRa 公司进行核酸序列测定,结果表明,甜味蛋白基因其组成各段基因碱基未发生突变,整个表达载体阅读框正确无误,与预期设计目标一致。

(上接第6172页)

于其他微生物类群,是一种鉴别培养基,可以快速、准确地分离获得样本中纤维分解菌^[4]。

实验结果表明,牛粪的高温纤维分解菌数量显著或极显著多于马粪和陈垃圾土,纤维素刚果红培养基分离的高温纤维分解菌数量最多,赫奇逊滤纸培养基分离获得的高温纤维分解菌的CMC酶活力较强,这2种培养基是分离纤维分解菌效果较好的培养基。

参考文献

- [1] 王志超,陆文静,王洪涛.好氧堆肥中高温纤维素分解菌的筛选及性状研究[J].北京大学学报:自然科学版,2006,42(2):259-264.
- [2] 李玉红,王岩,李清飞.外源微生物对牛粪高温堆肥的影响[J].农业环境科学学报,2006,25(9):609-612.

3 讨论

首先,由于甜味蛋白 Brazzein 甜度高,用量少,且安全无毒,因此可以作为食品、饮料、医药工业上甜味剂,这是甜蛋白最重要的用途之一。其次,与化学合成的甜味剂相比,其口味纯正、天然无毒、无致癌性,具有非常广阔的应用前景。第三,甜蛋白基因可以用作生物技术中的报告基因。所以甜味蛋白 Brazzein 作为一种天然非糖类的甜味剂,很有希望发展成为食品工业中营养性碳水化合物化合物的替代品,成为新一代甜味剂^[1]。

利用基因工程的方法生产 Brazzein 是势在必行。大肠杆菌表达系统是一类常用的表达系统,具有遗传背景清楚、生长迅速等优点。但是由于表达产物常以包含体的形式存在,纯化后的蛋白还需要进一步的复性才具有活性。因此为克服这些缺点,最好采用真核的表达系统,而该基因在毕赤酵母表达报道较少。毕赤酵母表达系统为20世纪80~90年代发展起来的优良的酵母表达系统,已被广泛用于外源蛋白的表达。在真核表达系统中,毕赤酵母表达系统比其他真核表达系统具有操作简单、表达量高等优点,且表达出的蛋白具有一定的生物活性^[5]。毕赤酵母组成型表达载体 pGAPZ 和 pGAPZ 能产生比诱导型表达载体 pH CZ 和 pPICZ 更高的外源蛋白,且不需要甲醇诱导,无毒性,操作简单。

该研究在设计时为了提高目的蛋白的表达量,人工合成 Brazzein 基因时对基因进行了一定的改造,按照酵母密码子的偏好性对 Brazzein 基因序列进行了优化。并选择了组成型表达载体 pGAPZ A,成功构建了酵母表达载体 pGAPZ A Bra,为该基因进一步在酵母中转化和表达提供基础,从而预获得有生物活性的产物,这也是笔者目前正在进行的工作。

参考文献

- [1] FARIBA M, ASSADI-PORTER, DAVID J, et al. Efficient production of recombinant brazzein, a small, heat-stable, sweet-tasting protein of plant origin[J]. Arch Biochem Biophys, 2000, 376(2): 252-258.
- [2] 范长胜. 甜味蛋白的开发与应用研究[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(12): 50-54.
- [3] GAO G H, DAI J X, MING D, et al. Solution conformation of brazzein by nuclear magnetic resonance resonance assignment and secondary structure [J]. Internat Mol Microbiol, 1999, 24: 351-359.
- [4] SV G E, ANDERSSON, KURLAND C G. Codon preferences in free living microorganisms[J]. Amer Soc Microbiol, 1990(6): 198-210.
- [5] 彭彦孟, 连继勤. 毕赤酵母表达系统[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(7): 638-640.
- [3] 中国科学院土壤研究所微生物室. 土壤微生物研究法[M]. 北京: 科学出版社, 1985.
- [4] 叶姜瑜. 一种纤维素分解菌鉴别培养基[J]. 微生物学通报, 1997, 24(4): 251-252.
- [5] 杨静, 袁振宏, 易维明, 等. 高酶活力甜高粱秸秆纤维分解菌株的筛选[J]. 农机化研究, 2007(5): 169-171.
- [6] 孙晓华, 罗安程. 纤维素分解菌的分离、筛选及其环境适应性初步研究[J]. 科技通报, 2005, 21(2): 236-241.
- [7] 席北斗, 李英军, 刘鸿亮, 等. 纤维素分解菌和EM菌协同作用在有机废弃物堆肥中的应用[J]. 环境与开发, 2001, 16(4): 16-18.
- [8] 张毅民, 吕学斌, 万先凯, 等. 一株纤维素分解菌的分离及其粗酶性质研究[J]. 华南农业大学学报, 2005, 26(2): 69-72.
- [9] 夏服宝, 邱雁临, 孙宪迅. 纤维素酶活力测定条件研究[J]. 饲料工业, 2005, 26(16): 23-26.
- [10] 徐智, 汤利, 毛昆明, 等. 牛粪对西番莲果渣高温堆肥腐熟进程的影响[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(2): 507-511.