

鲜味八肽的表达载体构建及表达效果验证

张崧, 卢洲, 熊伟, 苟兴华, 郭思亚, 边杨

(成都大学肉类加工四川省重点实验室, 四川成都 610106)

摘要: 鲜味肽是近年来新发现的呈味物质, 但国内外对其呈味效果存在争议。导致这一争议的可能原因是验证鲜味肽呈味效果的方法主要是采用化学合成法。为了制备生物源鲜味肽, 以便对鲜味肽呈味效果进行再评价, 本文以争议性鲜味八肽为目标肽, 采用基因工程法, 构建了制备生物源鲜味肽的表达载体, 并对其表达效果进行了验证。根据争议性鲜味八肽的一级结构 Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala 和大肠杆菌 *E.coli* BL21 (DE3) 的密码子偏爱性, 设计了该鲜味八肽的 DNA 序列, 并将其克隆在 pET-32a(+) 上形成表达载体。通过菌落 PCR 检测阳性克隆、重组质粒鉴定及工程菌的诱导表达, 结果发现, 鲜味八肽的目的基因成功重组在 pET-32a 载体上, 所得 pET-32a 鲜味肽重组载体转化大肠杆菌后能够正常表达融合蛋白。这为后续获得生物源鲜味八肽奠定了基础。

关键词: 鲜味肽; 大肠杆菌; 工程菌; 载体

文章编号: 1673-9078(2017)2-89-3

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.2.014

Construction and Validation of an Expression Vector for Umami Octapeptide

ZHANG Yin, LU Zhou, XIONG Wei, GOU Xing-hua, GUO Si-ya, BIAN Yang

(Sichuan Provincial Key Laboratory of meat processing, Chengdu University, Chengdu 610106, China)

Abstract: Umami peptide is a recently identified umami substance, but its taste is controversial domestically and internationally. The possible reason for the controversy is that the method of verifying its taste is mainly based on chemical synthesis. In order to obtain natural umami peptide for the further evaluation of the umami peptide taste, the controversial umami octapeptide was used as the target peptide, gene engineering was adopted to construct an expression vector for the octapeptide, and its expression effect was verified. The DNA sequence of the octapeptide was designed according to the primary structure of the octapeptide, Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala, and codon bias of *Escherichia coli* BL 21 (DE3), and was cloned into pET-32a (+) to form the expression vector. Through colony polymerase chain reaction (PCR) identification of positive clones, identification of the recombinant plasmid, and the induced expression of the engineered bacteria, it was found that the target gene of the octapeptide was successfully restructured into the pET-32a vector, and the recombinant pET-32a vector-transformed *E. coli* could normally express the fusion protein. This method will lay a solid foundation for obtaining the natural octapeptide in the future.

Key words: umami peptide; *Escherichia coli*; engineering bacteria; vector

鲜味肽是近年来发现的一种新型呈味物质, 但国内外对其呈鲜效果存在争议。以最早发现的鲜味八肽 (Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala, LGAGGSLA) 为例, Yamasaki 等在 1978 年从牛肉的木瓜蛋白酶酶解液中分离得到后, 进一步通过化学合成的方法验证了该肽的呈味效果, 得出其呈现鲜味^[1,2]。Tamura 和 Wang 等同样采用化学合成法验证该肽的风味, 均得出其呈现鲜味^[3,4]。然而, Van Wassenaar 等在 1995 年

收稿日期: 2016-07-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31501505)

作者简介: 张崧 (1981-), 男, 博士, 副教授, 主要从事畜产品加工与保藏研究

通讯作者: 苟兴华 (1963-), 男, 教授, 研究方向: 功能性肽的生物表达

通过化学合成法再次验证该肽的呈味效果时, 却得出该肽根本无鲜味的结论^[5]。Van Wassenaar 和 Van den Oord AHA 等认为在化学合成该肽时引起的一些副产物可能影响了鲜味的准确评价。由此可见, 采用化学合成法验证鲜味肽的风味可能是导致鲜味肽呈鲜效果出现争议的主要原因。因此, 急需开发一种制备天然肽的方法, 以进一步验证该鲜味肽的呈味效果和为其他鲜味肽呈味效果的验证提供借鉴。

近年来出现的基因工程技术, 为生物肽的合成提供了良好工具。大肠杆菌是基因工程研究和应用中最成熟和最完善的表达系统, 目前采用大肠杆菌表达经修饰和改性的功能性肽取得了良好的效果。Li 将人源性抗菌肽 LL-37 与硫氧还蛋白融合, 然后在大肠杆菌

中成功表达^[6]；Xia 等将硫氧还蛋白与抗菌肽 cecropinXJ 融合，在大肠杆菌中融合后分离纯化得到的抗菌肽对金黄色葡萄球菌具有良好的抑菌活性^[7]。Wu 等在大肠杆菌中成功表达了抗菌肽 metchnikowin 融合蛋白等^[8]。因此，利用大肠杆菌制备生物源鲜味八肽具备研究基础。在此基础上，为了开发一种不同于化学合成法验证鲜味肽风味的方法，本文以争议性鲜味八肽 LGAGGSLA 为原料，构建了 LGAGGSLA 的表达载体，并对其在大肠杆菌中的表达效果进行了验证，以便为后期分离纯化，制得天然 LGAGGSLA 肽和后期对该肽的鲜味评价和其他鲜味肽风味的再评价提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

E.coli BL21、*E.coli* JM109 及表达载体 pET-32a(+) 均为本实验室保存。限制性内切酶 EcoR I 和 Bgl II、T4 DNA 连接酶，购于大连宝生物公司；Taq PCR Mixmaster 购于博迈德公司；质粒小提试剂盒购于康为世纪生物科技有限公司；实验中所用其他试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 鲜味肽基因的获得

根据大肠杆菌密码子偏爱性及 LGAGGSLA 氨基酸的一级结构，利用序列设计软件 Sequence Quickie-Calc 3.1 设计了在大肠杆菌中可以高效表达鲜味肽的 DNA 序列：5'-AAGGTTGATGAGGAGTCT CTTGCT-3'。同时，为了便于与表达载体 pET-32a(+) 进行重组和后续肽的分离，在鲜味肽基因 5' 端加入了一个 Bgl II 酶切位点(A¹GATCT)和一个肠激酶识别位点(AspAsp AspAspLys¹)，在鲜味肽基因 3' 端加入了一个 EcoR I 酶切位点(G¹AATTC)和两个终止密码子 TAA、TAG，最终得到 DNA 序列：5'-CCCAGATCTGGGTACCGA TGATGATGATAAGAAGGTTGATGAGGAGTCTCT TGCTTAATAGGAATTCGAGCTC-3'。

1.2.2 重组质粒的构建

本次实验选取 pET-32a(+) 作为表达载体，重组质粒构建过程见图 1。LGAGGSLA 基因的 5' 端含有一个 Bgl II 酶切位点，3' 端含有一个 EcoR I 酶切位点，用 Bgl II 和 EcoR I 分别双酶切 pET-32a(+) 和设计的 LGAGGSLA 基因，然后用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离出各自的酶切片段，在紫外透射仪中用刀片割下目的条带凝胶，利用 DNA 回收试剂盒回收酶切片段。最后，

在 EP 管中按下表加样，16 °C 保温 30 min 进行连接，从而将 LGAGGSLA 基因插入到 pET-32a(+) 的多克隆位点，即得到重组质粒。

表 1 重组质粒连接反应体系

Table 1 Ligation reaction system for recombinant plasmid

| 组分 | 体积/μL |
|--|--------------|
| LGAGGSLA DNA-Bgl II/EcoR I | 2 (约 200 ng) |
| pET-32a(+)- Bgl II/EcoR I | 1(约 50 ng) |
| ddH ₂ O | 2 |
| Solution I (TaKaRa DNA Ligation Kit 的组分) | 5 |

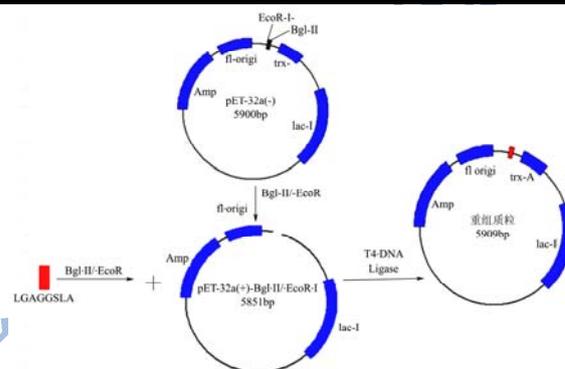


图 1 重组质粒的构建流程图

Fig.1 Flow chart of recombinant plasmid construction

1.2.3 重组质粒的鉴定

表 2 菌落 PCR 反应体系

Table 2 Colony PCR reaction system

| 组分 | 体积/μL |
|----------------------|-------|
| 裂解上清液 | 2 |
| 引物 P1 | 2.5 |
| 引物 P2 | 2.5 |
| 2×Taq PCR Master Mix | 12.5 |
| dd H ₂ O | 5.5 |
| 总体积 | 25 |

将 1.2.2 得到的连接液全部转化至 *E.coli* JM109，取 50 μL DNA 纯化试剂 (Lysis Buffer for Microorganism to Direct PCR) 于灭菌的 EP 管中，用灭菌牙签挑取 LB 固体 (含 100 μg/mL Amp) 平板上的单菌落置于 EP 管中搅动数次后取出，80 °C 热变性 15 min 后离心，取上清液作为模板。用引物 P1：5'-TAATACGACTCACTATAG-3' 和引物 P2：5'-AGC AAGAGACTCCTCATCACCCCTT-3' 进行 PCR，筛选阳性克隆，PCR 反应体系见表 2。同时取 1 μL pET-32a(+) 稀释 10 倍后取 1 μL 作为模板，进行 PCR 反应。菌落 PCR 反应条件为 94 °C、5 min，(94 °C、30 s；56 °C、30 s；72 °C、35 s) 循环 30 次，最后 72 °C 延伸 10 min。将扩增后的菌落接种到 LB 液体培养基 (含 100 μg/mL Amp) 中 37 °C、200 r/min 过夜培养，利用质粒提取

试剂盒提取质粒,再用 EcoR I 单酶切重组质粒,进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测重组质粒大小。最后,选取引物 T7t: 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'作为测序引物对重组质粒进行测序。

1.2.4 *E.coli* BL21 感受态细胞的制备

用移液器移取 20 μ L、-20 $^{\circ}$ C 保存的 *E.coli* BL21 甘油菌液,接种到 20 mL 液体 LB 培养基中,在 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下培养过夜,次日取 200 μ L 菌液转接 20 mL 液体 LB 培养基中,在 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下培养至菌液呈现雾状时(约培养 2 h),将三角瓶放置冰中停止培养。取 1 mL 菌液与 EP 管中,在 4000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,弃上清。向每个 EP 管中加入 100 μ L Competent Cell Preparation Kit 中的冰中预冷的 Solution A,轻轻弹动 EP 管使菌体沉淀悬浮,4000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 5 min 后弃上清。在每个 EP 管中加入 100 μ L Competent Cell Preparation Kit 中的冰中预冷的 Solution B,轻轻悬浮菌体沉淀,-20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.5 重组质粒转化 *E.coli* BL21 感受态细胞

取 1 μ L 重组质粒于 EP 管中,用无菌水稀释 10 倍后,加入 100 μ L *E.coli* BL21 感受态细胞,轻轻混匀后冰浴 30 min,再将 EP 管放入金属浴中 42 $^{\circ}$ C 热激 90 s 后,立即冰中放置 2 min。然后加入 890 μ L 液体 LB 培养基,37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 1 h,取 50 μ L 培养液涂布于含 100 μ g/mL Amp 的 LB 固体平板上,将平板倒置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养。同时,也将 pET-32a (+)按此步骤转化 *E.coli* BL21。

1.2.6 LGAGSLA 工程菌的构建及表达

随机挑取 8 个转化平板上的单菌落,接种于 LB 液体培养基(含 100 μ g/mL Amp),在 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下培养过夜。次日,按 1%接种量转接新鲜液体 LB(含 100 μ g/mL Amp)中培养至 OD₆₀₀ 值约为 0.6,加入终浓度为 0.2 mM 的 IPTG,在 28 $^{\circ}$ C、200 r/min 下继续培养 4 h。

1.2.7 SDS-PAGE 检测重组蛋白

取 1 mL 诱导完的培养液,在 8000 r/min 离心 2 min 后弃上清,加入 1 mL PBS 溶液悬浮菌体,在 8000 r/min 离心 2 min 后弃上清。再加入 100 μ L PBS 悬浮菌体,取 20 μ L 菌液加入 5 μ L 的 5 \times SDS-PAGE Loading Buffer,混匀后煮沸 10 min,5000 r/min 离心 3 min 后取 10 μ L 进行电泳。采用 15%的分离胶和 5%浓缩胶溶液分别制作分离胶和浓缩胶。开始先在 15 mA 的电流下电泳,待样品从浓缩胶完全进入分离胶之后,调整为 30 mA 进行电泳。

1.2.8 电泳图分析

参照张崑等^[9]的回归法,对电泳胶中的碱基对数

量进行计算。

2 结果与讨论

2.1 PCR 检测阳性克隆

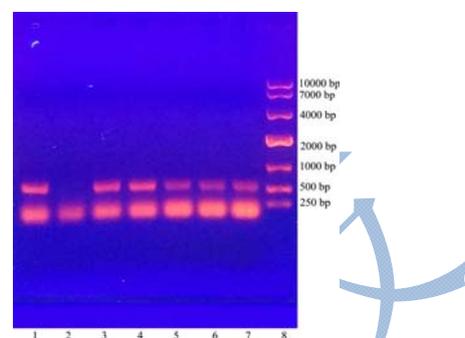


图2 菌落 PCR 电泳图谱

Fig.2 Electrophoresis image of colony PCR

注:图中泳道 1、3、4、5、6 和 7 为转化子扩增;泳道 8 为 DL10000 DNA Marker;泳道 2 为 pET-32a(+)扩增。

为了分析目的基因是否成功克隆至 pET-32a(+)载体,对转化后的菌落进行菌落 PCR 扩增。图 2 为菌落 PCR 电泳图,图中 1、3、4、5、6 和 7 的转化子扩增泳道,2 为以 pET-32a(+)为模板进行 PCR 后的泳道。根据 pET-32a(+)和目的基因的序列,克隆成功的阳性转化子通过菌落 PCR 后,可以扩增出一条 585 bp 的片段。

图 2 中 1、3、4、5、6 和 7 的转化子扩增泳道显示,均出现碱基数大于 500 bp 的条带,而以 pET-32a(+)为模板进行 PCR 后的泳道 2 未出现任何条带。对泳道 1、3、4、5、6 和 7 的碱基对数进行定量分析,得出泳道 1、3、4、5、6 和 7 的碱基对数平均为 574.8 bp。这与理论推算的 585 bp 非常接近。由此可以初步确定鲜味 8 肽基因已经克隆到 pET-32a(+)上。

2.2 重组质粒的鉴定

2.2.1 1%琼脂糖凝胶电泳检测重组质粒大小

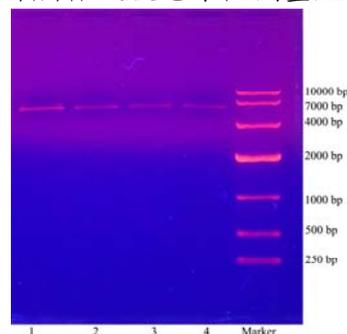


图3 重组质粒和 pET-32a (+) EcoR I 单酶切电泳图

Fig.3 Electrophoresis image of recombinant plasmid and pET-32a (+) cut by single restriction enzyme EcoR I

注：图中泳道 1、2 和 3 为重组质粒 EcoR I 单酶切泳道；4 为 pET-32a(+)EcoR I 单酶切泳道。

图 2 为重新质粒的琼脂糖凝胶电泳图。图中泳道 1、2 和 3 为重组质粒 EcoR I 的单酶切泳道，4 为 pET-32a(+)EcoR I 的单酶切泳道。图中电泳条带显示，酶切后的重组质粒和空质粒 pET-32a(+)条带位置几乎一致。对重组质粒和空质粒的碱基对数量进行计算，得出重组质粒对应的泳道 1、2 和 3 的碱基对数分别为 5680.28 bp、5719.61 bp 和 5719.61 bp，空质粒 pET-32a(+)的碱基对数为 5719.08 bp。由此可见，重组质粒和空质粒的碱基对数非常接近。

根据重组质粒的构建过程可知（图 1），空质粒的碱基对数为 5900 bp，重组 8 肽后质粒的碱基对数为 5909 bp，两者的碱基对数非常接近。这与实际计算出的重组质粒与空质粒的碱基对数比较接近的结果相符。尽管通过碱基对数计算得出的空质粒和重组质粒的碱基对数值非常接近，但是为了更进一步验证鲜味八肽已经成功与空质粒重组，对重组质粒进行了进一步测序验证。

2.2.2 重组质粒测序鉴定

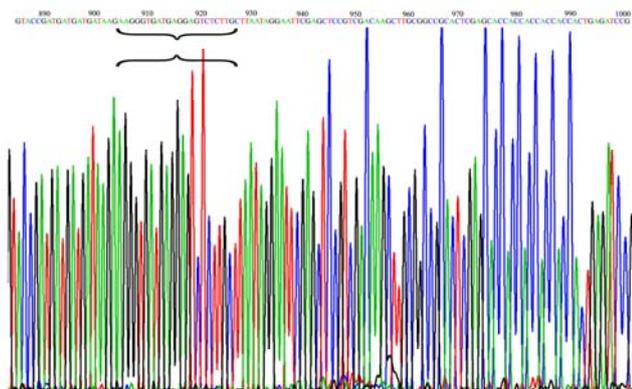


图 4 重组质粒测序图谱

Fig.4 Sequencing of the recombinant plasmid

重组质粒测序结果见图 4。经过对空质粒和重组质粒的 DNA 序列进行逐一比对，得出鲜味八肽的 DNA 序列 5'-AAGGGTGATGAGGAGTCTCTTGCT-3'位于 905-928 处（见图中大括号），且 DNA 序列与设计的序列完全一致，而且目的基因两端的序列与 pET-32a(+)对应的序列相一致。综合单酶切电泳结果，可以说明鲜味 8 肽基因已经成功克隆到表达载体 pET-32a(+)上。

2.3 重组质粒转化 E.coli BL21

为了进一步通过重组质粒在大肠杆菌中表达获得融合蛋白，将重组质粒在感受态 E.coli BL21 中转化，所得菌落生长情况见图 5。图 5a 为重组质粒与感受态

细胞冰浴、热激后加液体 LB 培养 1 h 后取 50 μL 培养液涂布培养结果；图 5b 为 100 μL 感受态细胞直接涂布培养的结果。由于 LB 固体培养基中加入了抗生素 Amp，重组质粒因为有抗性基因，所以能正常生长，而感受态大肠杆菌中不含有抗性基因，所以受抗生素的作用而使其不能在平板上生长。因此，由图 5 的菌落生长情况说明，重组质粒已经成功转化至感受态细胞。

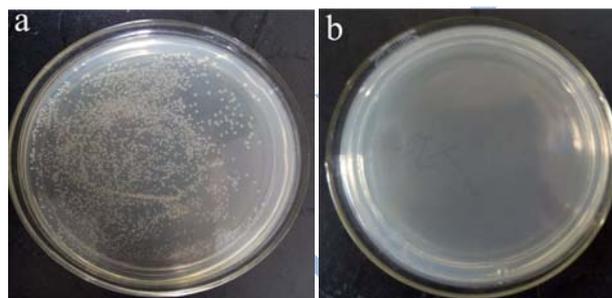


图 5 重组质粒转化

Fig.5 Transformation of the recombinant plasmid

注：图 a 表示重组质粒与感受态细胞冰浴、热激后加液体 LB 培养 1 h 后取 50 μL 培养液涂布培养结果；图 b 表示 100 μL 感受态细胞直接涂布培养结果。

2.4 SDS-PAGE 检测重组蛋白

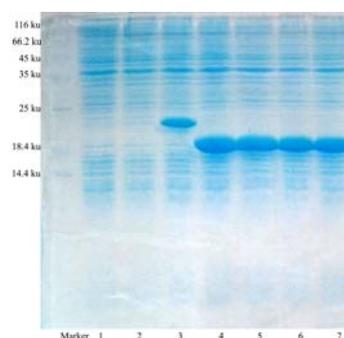


图 6 重组蛋白 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.6 SDS-PAGE image of the recombinant protein

注：图中 1 为 pET-32a(+)空载体诱导前；2 为重组质粒诱导前；3 为 pET-32a(+)空载体诱导后；4~7 为转化子诱导后。

在构建表达载体基础上，对所构建工程菌的表达效果进行了验证。图 6 为转化大肠杆菌培养后全菌重组蛋白的 SDS-PAGE 电泳图。图中泳道 1 为 pET-32a(+)空载体诱导前泳道；泳道 2 为重组质粒诱导前泳道；泳道 3 为 pET-32a(+)诱导后泳道；泳道 4~7 为挑取的 4 个转化子的诱导后泳道。比较图 6 中泳道 1、2 和 3、4 可知，诱导剂 IPTG 对融合蛋白的正常表达非常重要。比较图 4 泳道 3 和泳道 4、5、6、7 可知，空质粒和重组质粒诱导后均可以表达蛋白，但重组质粒表达后的融合蛋白的分子量较空质粒高。

根据重组质粒的基因序列,可以推测重组质粒转化后的工程菌表达形成的多肽会有 166 个氨基酸组成,其分子量约为 18.26 ku (以每个氨基酸的分子量 110 估算)。这与图 4 中泳道 4, 5, 6, 7 的融合蛋白的分子量为 18.4 ku 的结果相符。因此,所构建的鲜味八肽表达载体不仅能够成功表达融合蛋白,而且所得融合蛋白的分子量符合理论预期。

3 结论

为了建立一种制备生物源鲜味肽的方法,以争议性鲜味八肽 LGAGGSLA 为对象,通过基因表达法对争议性鲜味八肽的表达载体进行了构建。根据 LGAGGSLA 的一级结构 Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala 和 *E.coli* BL21 密码子偏爱性,设计出表达鲜味八肽的 DNA 序列,经过修饰后将其克隆在 pET-32a(+)上形成重组表达载体。通过菌落 PCR 筛选阳性克隆、重组质粒鉴定及工程菌的诱导表达,得出所构建鲜味八肽的表达载体符合预期,形成的工程菌能成功表达融合蛋白。这为后续通过酶切、纯化,获得生物源鲜味八肽奠定了基础。

参考文献

- [1] Yamasaki Y, Maekawa K. A peptide with delicious taste [J]. *Agric. Biol. Chem.*, 1978, 42(9): 1761-1765
 - [2] Yamasaki Y, Maekawa K. Synthesis of a peptide with delicious taste [J]. *Agricultural and Biological Chemistry (Japan)*, 1980: 93-97
 - [3] Tamura M, Nakatsuka T, Tada M, et al. The relationship between taste and primary structure of "delicious peptide"(Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala) from beef soup [J]. *Agricultural and Biological Chemistry (Japan)*, 1989, 53(2): 319-325
 - [4] Wang K, Maga J, Bechtel P. Taste properties and synergisms of beefy meaty peptide [J]. *Journal of Food Science*, 1996, 61(4): 837-9
 - [5] Van Wassenaar P D, Van Den Oord A H, Schaaper W M. Taste of "delicious" beefy meaty peptide [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995, 43(11): 2828-2832
 - [6] Li Y F. A novel protocol for the production of recombinant LL-37 expressed as a thioredoxin fusion protein [J]. *Protein Expr. Purif.*, 2012, 81(2): 201-210
 - [7] Xia L J, Zhang F C, Liu Z Y, et al. Expression and characterization of cecropinXJ, a bioactive antimicrobial peptide from *Bombyx mori* (*Bombycidae*, *Lepidoptera*) in *Escherichia coli* [J]. *Exper. Therap. Med.*, 2013, 5(6): 1745-1751
 - [8] Wu D, Lu Y H, Huang H Q, et al. High-level secretory expression of metchnikowin in *Escherichia coli* [J]. *Protein Expr. Purif.*, 2013, 91(1): 49-53
 - [9] 张崑,王新惠,王卫,等.骨素及骨素酶解液中蛋白质及肽的电泳分离[J].现代食品科技,2015,31(6):178-182
- ZHANG Yin, WANG Xin-hui, WANG Wei, et al. Electrophoretic separation of proteins and peptides in bone extract and bone extract hydrolysates [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2015, 31(6): 178-182