

# 甜蛋白 Monellin 在毕赤酵母中的分泌表达

刘西常<sup>1</sup>, 张玉军<sup>1</sup>, 于红<sup>2</sup>

(1. 山东万杰医学高等专科学校, 山东 淄博 255213) (2. 青岛大学医学院, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 本研究采用毕赤酵母偏爱密码子, 人工合成了高甜度 Monellin 基因, 并构建了重组分泌型酵母表达载体 pPIC9M, 通过电击转化获得了可高效分泌表达有甜味活性高甜度 Monellin 的重组毕赤酵母 GS115/pPIC9M。通过 PCR 检测证实 Monellin 基因已经整合进酵母基因组, SDS-PAGE 和 Western blot 免疫杂交知所表达的蛋白是目的蛋白, 最后通过双盲测定证实表达的蛋白存在正常活性。

**关键词:** 甜蛋白; Monellin; 毕赤酵母; 分泌表达

中图分类号: Q51; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)01-0020-03

## Secretory Expression of Monellin in Yeast *Pichia pastoris*

LIU Xi-chang<sup>1</sup>, ZHANG Yu-jun<sup>1</sup>, YU Hong<sup>2</sup>

(1. Shandong Wanjie Medical College, Zibo 255213, China)

(2. Qingdao University Medical College, Qingdao 266071, China)

**Abstract:** This experiment Pichia codon preference, a high sweetness synthetic gene Monellin, and the reorganization of production of yeast expression vector pPIC9M by electroporation can be a highly efficient expression of secretory activity sweet high sweetness Monellin reorganization Pichia GS115/pPIC9M. Monellin confirmed by PCR gene has been integrated into the yeast genome, SDS-PAGE and Western blot hybridization know immune expressed protein is the target protein final adoption of double-blind confirmed the presence of normal expression of activity.

**Key words:** sweet protein; Monellin; *Pichia pastoris*; secretion expression

Monellin 是西非热带植物 *Dioscoreophyllum cumminsii* 浆果中的一种天然甜味蛋白, 其甜度为等质量的蔗糖的 300 倍。与蔗糖不同, Monellin 的吸收和利用不依赖于胰岛素, 而且不存在类似糖精的食用安全性问题。由于甜度高、低热量和天然产物的特点, Monellin 的需求不断增长<sup>[1]</sup>。但是, 由于天然的甜蛋白的来源非常狭窄, 无法满足市场需求。早在 20 世纪 80 年代就开始了基因工程表达 Monellin 的研究<sup>[2]</sup>。现有的基因工程菌又存在产量低, 胞内表达提取困难的问题, 从而限制了 Monellin 的规模生产和广泛应用。本研究拟以人工合成的高甜度 Monellin 基因, 利用毕赤酵母表达系统, 构建高效表达、有效分泌高甜度 Monellin 的重组毕赤酵母生物反应器。以期解决目前 Monellin 基因工程菌存在的单产低、从胞内提取困难的两大难题。

## 1 材料

### 1.1 酶与主要试剂

收稿日期: 2007-09-19

作者简介: 刘西常 (1976-), 在职研究生

限制性内切酶、T4DNA 连接酶、E<sub>x</sub> TaqDNA 聚合酶等均购自日本 TaKaRa 公司。酵母用培养基见 Invitrogen 公司毕赤酵母试剂盒操作手册, 胰蛋白胨、酵母提取物来自 OXOID 公司, DNA Maker、蛋白质低分子量标准为 MBI 公司产品。其余试剂均为国产分析纯。

### 1.2 质粒与菌株

质粒表达载体 pPIC9K 和酵母菌菌种 GS115 由山东大学微生物国家重点实验室庄国强教授惠赠; 质粒克隆载体 pUC19、大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$  本校实验室保存。

### 1.3 基因来源

甜蛋白 Monellin 基因为本校按照 GenBank 报道方法合成。

## 2 方法

### 2.1 表达载体的构建

根据高甜度 Monellin 的氨基酸序列, 采用毕赤酵母偏爱密码子设计了高甜度 Monellin 基因。为了克隆方便, 在序列 5'端和 3'端分别引入 *Bam*HI 和 *Eco*RI

位点，并在两个酶切位点的外侧分别加上了3个保护碱基。为了保证高甜度 Monellin 基因按正确的阅读框架，融合到分泌表达载体的  $\alpha$ -因子信号肽编码序列的下游，基因序列前重建 *XhoI* 位点，通过 *BamHI* 和

*EcoRI* 位点将 Monellin 基因克隆进 pUC19，得到 pUC19M，然后用 *XhoI* 和 *EcoRI* 双酶切将 Monellin 基因克隆进 pPIC9K，获得 pPIC9M 表达载体。过程如图 1。

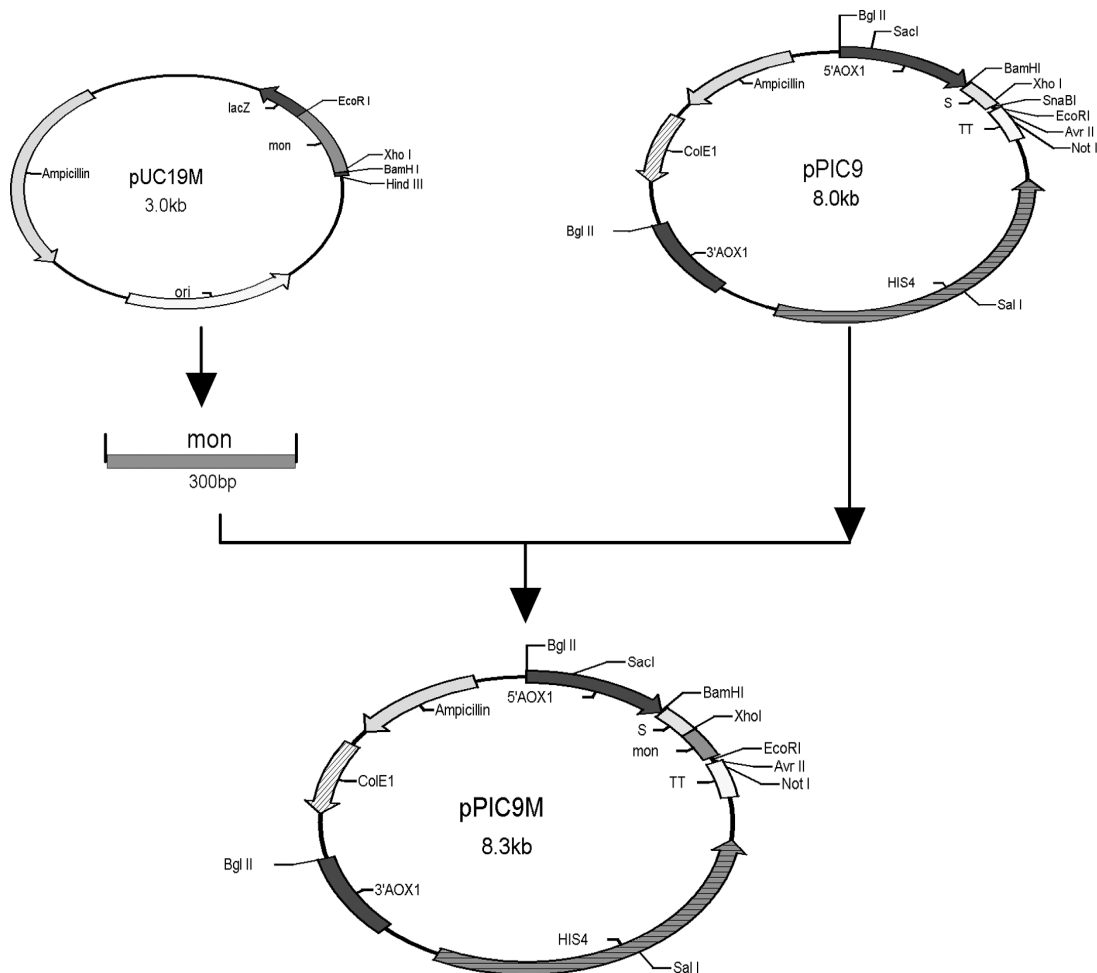


图 1 毕赤酵母重组表达载体 pPIC9M

Fig.1 Express Carrier of Yeast *Pichia pastoris*

2.2 酵母的转化和初筛

制备酵母 GS115 的感受态细胞，并将 *BglII* 线性化的重组质粒 DNA pPIC9KM 转化此感受态细胞，转化完成后涂布于 RDB 再生板上，30 °C 培养直至转化子出现。用牙签挑取转化子同时点种于 MD、MM 板上，选取在 MD 上生长正常而在 MM 平板上生长缓慢（表型为 His<sup>+</sup> Mut<sup>s</sup>）的转化子为阳性克隆子进行表达菌株的培养和诱导表达。

2.3 表达菌株的培养及诱导表达

将菌株接种于 2 mL YPD (10 g/L 酵母提取物，20 g/L 胰蛋白胨，20 g/L 葡萄糖) 中，30 °C、250 r/min 摇床培养过夜，再以 1% 的量接种于 10 mL BMGY 培养液 (10 g/L 酵母提取物，20 g/L 胰蛋白胨，0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液 pH 6.0，13.4 g/L YNB，4×10<sup>-4</sup> g/L 生物素)

素，10 g/L 甘油) 中，置于 30 °C，250 r/min 的摇床上培养至 OD<sub>600</sub> 达 4~8；5000 r/min 离心收集菌体后，用 20 mL BMMY 培养液 (10 g/L 酵母提取物，20 g/L 胰蛋白胨，0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液 pH6.0，13.4 g/L YNB，4×10<sup>-4</sup> g/L 生物素，5 mL/L 甲醇) 轻悬细胞后于 30 °C，250 r/min 诱导培养 48 h，12 000 r/min 离心 10 min，吸取上清-20 °C 保存。

3 结果

3.1 PCR 检测

用位于 Monellin 基因上游的  $\alpha$ -因子引物和位于 Monellin 基因下游 TT 终止子中的 3'-AOX1 primer site 引物，对筛选出的具有 His<sup>+</sup>Mut<sup>s</sup> 表型的重组子进行直接菌落 PCR 检测 (部分结果如图 2 所示)。共有 23

个重组子扩出约 470 bp 的 DNA 片段, 与以重组表达载体 pPIC9M 为模板扩增的结果一致; 受体菌 GS115 扩增结果为阴性。证明 PCR 阳性的重组子中有外源 DNA 片段的插入, 初步说明高甜度 Monellin 基因已整合到酵母基因组中。

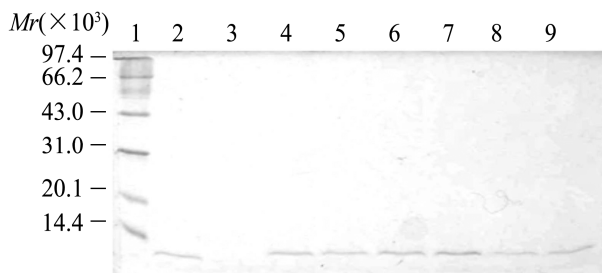


注: 1.1kb DNA Ladder; 2.GS115; 3.pPIC9M; 4, 5, 7, 9, 11, 12 阳性重组子; 6, 8, 10 阴性重组子

图 2 毕赤酵母重组子的 PCR 鉴定

Fig.2 PCR analysis of *Pichia pastoris* transformants

### 3.2 SDS-PAGE 蛋白检测



注: 1.低相对分子质量蛋白标准; 2.Monellin (阳性对照); 3.GS115/pPIC9; 4-9. GS115/pPIC9M-1~6

图 3 高甜度 Monellin 在重组酵母中分泌表达的 SDS-PAGE

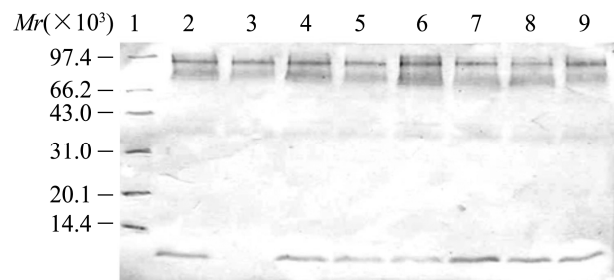
Fig.3 SDS-PAGE analysis of Monellin expressed in transformants

为了筛选得到高效分泌表达高甜度 Monellin 的重组酵母菌株, 对上述 23 个 PCR 阳性重组子以及空载体重组菌 GS115/pPIC9 同时进行诱导培养, SDS-PAGE 分析诱导上清中的蛋白表达。结果发现有 21 个重组子在相对分子质量约 11000 的位置有一条明显的蛋白带, 且相对分子质量与高甜度 Monellin 的理论相对分子质量相符, 而对照菌株在此处无蛋白带(部分结果如图 3 所示)。说明高甜度 Monellin 基因在毕赤酵母中得到分泌表达。另外, 所有重组子和对照菌株诱导上清中均无可见的杂蛋白带, 说明毕赤酵母自身分泌的本底蛋白非常少, 这将使高甜度 Monellin 的分离纯化更为简便。

### 3.3 Western blot 分析

从 Santa Cruz 购得第一抗体, 以 1:2000 的比例稀释, 以碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG 为第二抗体, 对

高甜度 Monellin 在重组酵母 GS115/pPIC9M-1~6 中的表达进行 western blotting 检测。



注: 1.低分子量蛋白标准; 2.Monellin(阳性对照); 3.GS115/pPIC9; 4-9. GS115/pPIC9M-1~6

图 4 重组酵母分泌蛋白的 western blotting 分析

Fig.4 Western blotting analysis of recombinant protein in media

结果(如图 4)显示, 空载体重组菌株诱导培养上清无杂交信号, 而重组酵母 GS115/pPIC9M-1~6 的上清都有明显的杂交带, 相对分子质量约 11000, 与高甜度 Monellin 的理论分子量相符。证明高甜度 Monellin 基因在重组酵母中得到了分泌表达。

### 3.4 高甜度 Monellin 甜度检测

取菌体上清液加硫酸铵至 70%饱和度, 边搅拌边加, 至硫酸铵完全溶解, 4℃沉淀过夜, 4℃下 10000 r/min 离心收集沉淀, 用 0.01 mol/L 的磷酸钠缓冲液 (pH=7.2) +2 mmol/L EDTA 溶解, 装于截留分子量为 8000 的透析袋, 用 0.01 mol/L 的磷酸钠缓冲液 4℃透析约 12 h, 其间换 3 次透析缓冲液。得到纯蛋白后, 通过试验人员双盲测试, 得到重组 Monellin 的甜度大于同等质量蔗糖的 1000 倍。

## 4 讨论

在本实验中, 我们采用优秀的真核表达载体毕赤酵母成功表达了 Monellin 甜蛋白。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。因此, 此转化子的获得为工业化生产 Monellin 甜蛋白打下了一定的基础。

## 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] 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