

# 乳酸乳球菌表面表达 Brazzein 甜味蛋白系统的建立

王长远\*, 许 凤, 沈冰蕾, 于长青, 姚 笛

黑龙江八一农垦大学食品学院, 大庆 163319

**摘要:** 参照甜味蛋白 Brazzein 基因序列, 结合乳酸乳球菌的密码子偏嗜性的相关分析, 对甜味蛋白 Brazzein 基因进行改造, 将第 29 位天冬氨酸、31 位的组氨酸和第 41 位的谷氨酸分别突变为赖氨酸、丙氨酸和赖氨酸, 以期提高目的蛋白的甜度。采用重叠 PCR 的方法合成目的基因, 目的片段亚克隆到 pMD18-T 载体上。经序列测定分析后, 目的片段克隆入分泌表达载体 pNZ8112, 电转化乳酸乳球菌中, 构建成表面展示表达甜味蛋白 Brazzein 的乳酸乳球菌表达系统。

**关键词:** 甜味蛋白; Brazzein; 乳酸乳球菌; 表面展示

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

## Surface Display of Brazzein in *Lactococcus lactis*

WANG Chang-yuan\*, XU Feng, SHEN Bing-lei, YU Chang-qing, YAO Di

College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China

**Abstract:** The gene encoding of Brazzein was modified according to the codon bias in *Lactococcus lactis* and three sense mutations in Brazzein, Asp29Lys, His31Ala, Glu41Lys were generated in an attempt to enhance the sweetness. The optimized gene was amplified by overlap PCR and the fragment was subcloned into pMD18-T vector, followed by being sequenced. The gene of interest was cloned into pNZ8112 expression vector and recombinant plasmid was transformed into *L. lactis* by electroporation to construct the surface display system for expression of the Brazzein protein on the surface of *L. lactis*.

**Key words:** sweet protein; Brazzein; *Lactococcus lactis*; surface display

目前在食品中普遍使用的蔗糖、葡萄糖、果糖等糖类添加剂易引起肥胖、糖尿、高血脂和龋齿等疾病, 已成为较为严重的社会问题。随着人们生活水平的提高, 人们对低热值甜味剂的需求量越来越迫切, 因此, 低热量的甜味剂被接受, 如糖精不提供热量, 也不被人体分解和吸收, 上百年来一直被用作食品和饮料的甜味剂<sup>[1]</sup>。同时, 也要求食品添加剂更加健康、安全。早期化学合成的甜味剂因口感不好并有致癌的嫌疑, 正逐渐退出市场, 如糖精、磺酰胺类等甜味剂。从天然资源中提取天然的甜味剂越来越受到人们的关注。Brazzein 作为一种高甜度、低热值的非糖甜味剂, 又具有甜度高、耐热性好、分子量小、水溶性好、对 pH 稳定等优点<sup>[2-5]</sup>。以上特点可有效解决目前在甜味蛋白生产过程中存在的稳定性差, 提取、加工困难等问题, 因此, 作为一种较理想

的糖类候选替代物, 并且 Brazzein 甜味纯正, 口感好; 不会使体内血糖升高; 不会引起口腔蛀牙; 无毒副作用; 可增进或改善食品风味。正是人们所期待的一类纯天然、多功能的理想甜味剂, 具有广泛的开发及使用前景<sup>[6]</sup>。

由于含有甜味蛋白的植物不能异地生产, 因此, Brazzein 的开发受资源、产地的限制。而化学合成成本昂贵, 目前难以进行规模生产。近十几年来, 生物技术的飞速发展开发为利用甜味蛋白提供了非常有用的工具, 尤其是利用基因工程技术将甜味蛋白基因克隆到微生物细胞中, 构建生产甜味蛋白的基因工程菌, 为商品化生产甜味蛋白开辟了一条快速而有效的新途径。利用基因工程的方法生产 Brazzein 是势在必行。本研究根据密码子偏嗜性构建甜味蛋白 Brazzein 乳酸乳球菌表面展示载体。为增加甜度, 对其中对第 29、31、41 位氨基酸进行突变并进行密码子优化<sup>[7]</sup>。通过测序及酶切鉴定证实本实验成功构建 Brazzein 乳酸菌表面展示载体, 现将具体过程报告如下。

## 1 实验材料

Brazzein 菌株和 pNZ8112 质粒由黑龙江八一农垦大学食品学院保存。实验中所用限制内切酶 *Xba* I、*Sph* I、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、pMD<sup>®</sup> 18-T Vector、DL 2000 Marker、dNTPs 均购自宝生物工程(大连)有限公司; *pfu* DNA Polymerase 购自 Fermentas 公司; Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System 试剂盒购自 Promega; 琼脂糖购自 Spanish 公司; 质粒小提试剂盒购自 Tiangen 公司; 常规生化试剂均为国产分析纯。引物及序列测定委托北京六合华大基因科技股份公司完成。

## 2 实验方法

### 2.1 Brazzein 基因引物的设计与合成

根据已报道文献中 Brazzein 氨基酸序列及甜味决定位点<sup>[8]</sup>, 结合乳酸乳球菌密码子偏嗜性设计 Brazzein 基因序列, 将第 29 位的天冬氨酸 Asp 突变为赖氨酸 Lys, 第 31 位的组氨酸 His 突变为丙氨酸 Ala, 第 41 位的谷氨酸 Glu 突变为赖氨酸 Lys, 并根据 pNZ8112 多克隆位点的特点以及 Brazzein 基因序列的酶切特点, 设计四对引物并在引物 P1 中引入 *Sph* I 酶切位点, 在 P8 中引入 *Xba* I 酶切位点, 利用重叠 PCR (SOE-PCR) 方法合成全长为 173bp 的 Brazzein 基因产物, 引物设计如下:

P1: 5'-GCGGCATGCGATAAGTGCAAGAAGGTT-TATGAAAACCTATCCT-3' (*Sph* I)

P2: 5'-GTTTCTAAGTGCCAACTGGCTAAC-CAATGCAACTATGATTGC-3'

P3: 5'-AGCCAGTTGGCACTTAGAAACAGGAT-AGTTTTCATAAACCTT-3'

P4: 5'-GCGAGCAGCCTTCTTCAGCTTGCAAT-CATAGTTGCATTGGTT-3'

P5: 5'-AAGCTGAAGAAGGCTGCTCGCTCTG-GCGAATGCTTTTATGAT-3'

P6: 5'-AAGAAGCGCAACCTGCAATGCATCT-GCGATTATTGCGAATAT-3'

P7: 5'-GCATTGCAGGTTGCGCTTCTTATCATA-AAAGCATTCGCCAGA-3'

P8: 5'-TCTAGAGTATTCGCAGTAGTCGCAGAT-3' (*Xba* I)

### 2.2 PCR 扩增目的基因

重叠 PCR 分为两个反应, 初次反应体系 (20  $\mu$ L

反应体系): 10  $\times$  pfu buffer 2.0  $\mu$ L, 引物 P2、P4、P5、P7 各 1  $\mu$ L, dNTP 2  $\mu$ L (2.5 mM), *pfu* DNA Polymerase (Fermentas) 0.2  $\mu$ L (1.25U), ddH<sub>2</sub>O 补充至 20  $\mu$ L。扩增条件为: 95  $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 5 min, 1 个循环。将初次 PCR 产物作为模板进行二次 PCR。反应体系 (50  $\mu$ L 反应体系): 10  $\times$  pfu buffer 5.0  $\mu$ L, 引物 P1、P3、P6、P8 各 1  $\mu$ L, dNTP 4  $\mu$ L (2.5 mM), *pfu* DNA Polymerase (Fermentas) 0.5  $\mu$ L (1.25U), dd H<sub>2</sub>O 补充至 50  $\mu$ L。反应条件为 95  $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 95  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环, 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

### 2.3 Brazzein 基因产物的亚克隆

采用的是 Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System 试剂盒对 PCR 产物进行纯化, 纯化产物加“A”后, 克隆入 pMD18-T Vector, 转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞。重组质粒经 *Sph* I 和 *Xba* I 双酶切鉴定后, 阳性质粒命名为 pMD18-T-Brazzein。阳性重组菌送往北京华大基因科技股份有限公司测序。通过 DNAs-tar 软件进行序列分析。

### 2.4 pNZ8112-Brazzein 表达载体构建

pMD18-T-Brazzein 阳性质粒及表达载体 pNZ8112 分别经 *Sph* I 和 *Xba* I 双酶切, 酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 然后采用 Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System 试剂盒分别对目的片段进行回收纯化。双酶切后的 Brazzein 基因和 pNZ8112, 经 T4 DNA 连接酶连接后, 将连接产物全量电转化乳酸乳球菌 NZ9000 感受态细胞。转化参数: 将感受态细胞和连接产物的混合物转入 2 mm 的预冷电转化杯中; 迅速电击; 电击参数为电压 2500V, 电击时间 5 ms, 迅速加入 800  $\mu$ L 冰预冷的 M17 液体培养基, 混匀; 将菌液转移至 1.5 离心管中, 冰上放置 10 min, 37  $^{\circ}$ C 静止培养 2 h。取 200  $\mu$ L 菌液涂布于 M17 琼脂培养基 (植物蛋白胨 5 g, 酵母粉 5 g, 聚蛋白胨 5 g, 抗坏血酸 0.5 g, 牛肉膏 2.5 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.01 g,  $\beta$ -甘油磷酸二钠 19 g, 蒸馏水 1000 mL, 121  $^{\circ}$ C 灭菌 15 min) (含 10  $\mu$ g/mL 氯霉素), 37  $^{\circ}$ C 厌氧培养 36 h。

### 2.5 阳性重组表达载体的鉴定

挑取 M17 平板上的单菌落, 分别接种于含有 10  $\mu$ g/mL 氯霉素的 M17 液体培养基中, 37  $^{\circ}$ C 培养过夜后, 提取质粒。对重组质粒进行 *Sph* I 和 *Xba* I 双酶切鉴定, 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析结果。

### 3 实验结果

#### 3.1 Brazzein PCR 扩增结果

根据 Brazzein 的参考序列,通过两轮 PCR 扩增,对其进行了密码子优化和 3 个密码子突变,突变后扩增产物与预期大小一致(图 1)。

#### 3.2 序列测定结果

Brazzein 基因经密码子优化和突变后,PCR 扩增产物回收纯化,亚克隆至 pMD18-T 载体,经质粒扩增、纯化后,进行基因测序。结果证实:与参考序列比较,优化后的 Brazzein 基因只有在 29、31 和 41 位氨基酸发生了突变,结果如图 2 所示。

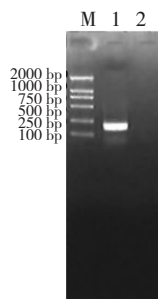


图 1 Brazzein PCR 扩增结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products of Brazzein  
M:DL2000 Marker;1: Brazzein 基因;2:阴性对照  
M:DL2000 Marker;1: Brazzein;2:negative control.

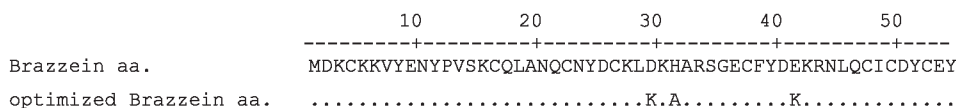


图 2 Brazzein 氨基酸序列比较

Fig. 2 Comparison between Brazzein reference sequence and optimized amino acid sequence

### 4 讨论

甜味蛋白 Brazzein 原产于非洲,由于提取过程复杂且产量较低所以利用生物工程技术大量获得目的蛋白是较为可行的方法。由于 Brazzein 是植物中表达的一种蛋白,目前在微生物中表达还不够理想,但投入大工业生产甜味蛋白最有效的途径仍然是微生物发酵。但随着酵母、大肠杆菌等表达系统研究的不断深入,选择其偏爱的密码子,构建高表达外源基因的载体,利用基因工程菌生产甜味蛋白仍具有极其诱人的前景。现在对甜味蛋白 Brazzein 的研究主要有三种方式:一是在大肠杆菌中表达 Brazzein<sup>[9]</sup>,二是在毕赤酵母中表达 Brazzein<sup>[1,7,10]</sup>,三是利用转基因植物表达 Brazzein<sup>[11,12]</sup>。国内已有多人将 Brazzein 基因在大肠杆菌中进行表达,都得到不同程度的表达量,但是其产物甜度不尽人意<sup>[9,13,14]</sup>。国内赵红玲等将含有 Brazzein 基因的 pPIC9K 穿梭质粒通过电导入巴斯德毕赤酵母 GS115 中,得到稍有微甜味的产物<sup>[10]</sup>。

乳酸菌表达系统是目前研究较为深入,应用较为广泛的原核表达体系。选择乳酸菌作为表达宿主菌是因为其可以通过改善人和动物菌群平衡,对机体产生益生作用,抵御外来致病菌的入侵,对常见致病菌有拮抗作用,并具有调节微生态平衡、营养、免疫赋活、抗氧化、抗突变和抗辐射作用,以及改善便

秘、降低胆固醇、减缓乳糖不耐症等功效,能通过改善人和动物菌群平衡而对机体产生有利的影响。目前,利用乳酸菌表达甜味蛋白的报道较少,相比于其它表达方式,乳酸菌具有独特的发酵能力,若将兼具表达甜味蛋白能力与发酵能力的乳酸菌应用于酸奶制造将会极大的降低酸奶制造过程中原材料的使用。本研究的目的是利用乳酸菌表达系统,构建高效表达、有效分泌的甜蛋白 Brazzein 重组生物反应器。利用分子生物学与基因工程技术表达在植物中含量甚微、且在我们本地不能种植的西非植物 *P. brazzeana* 中含有的甜味蛋白 Brazzein,以解决 Brazzein 生产中存在的天然产量低、提纯困难的两大问题。

本研究所使用的 pNZ8112 表达载体,具有 ssUSP 分泌信号肽,属分泌型表达载体。唐丽杰等人利用此表达系统来表达猪传染性胃肠炎 S 蛋白<sup>[15]</sup>,对其培养物上清液 10 倍浓缩后进行目的蛋白的检查,结果未检测到目的蛋白;菌体裂解物经 SDS-PAGE 分析可见在预期的分子量大小有目的蛋白的表达,Western blot 和免疫荧光试验表明所表达的蛋白初步定位于菌体的表面。Li 等通过该系统表达猪轮状病毒 VP4 外膜蛋白,同样也证明目的蛋白存在于菌体外表面<sup>[16]</sup>。本试验根据乳酸乳球菌的密码子偏嗜性,对 Brazzein 编码基因进行优化和突变,旨在提高目的蛋白的表达量和甜度;将优化后

的基因克隆入 pNZ8112 表达载体,来构建可以在乳酸乳球菌表面高水平表达 Brazzein 的表达系统,实现在乳酸菌表面表达甜味蛋白,省去目的蛋白表达后需要进行蛋白质纯化等下游操作,方便甜味蛋白的应用,可简化生产工艺、降低成本。本试验将乳酸菌可以大规模发酵以及甜味蛋白的表面展示两方面优势结合起来,为甜味蛋白 Brazzein 的工业化发酵研发提供了一定依据。

#### 参考文献

- 1 Wang CY(王长远),Zhang LP(张丽萍),Liu SC(刘松财),*et al.* Study on the expression of sweet protein Brazzein gene in the pichia pastoris yeast. *J Chin Inst Food Sci Tech* (中国食品学报),2009,5:43-48.
- 2 Ren XH(任晓慧),Zhang XW(张秀文). Brazzein, a high porency thermostable sweet protein. *Lette Biotechnol* (生物技术通讯),2005,4:470-471.
- 3 Hu Z(胡忠),He M(何敏). Study on the Mabinlin-I. abstraction, purification and some characteristics. *J Yunnan Veget Res* (云南植物研究),1983,2:207-212.
- 4 Hellekant G, Danilova V. Brazzein a small, sweet protein; discovery and physiological overview. *Chem Senses*, 2005, 30 Suppl 1:188-194.
- 5 Ming D, Hellekant G. Brazzein. a new high-potency thermostable sweet protein from *Pentadiplandra brazzeana* B. *FEBS Lett*,1994,355:106-108.
- 6 Zhu HX(朱海霞). Advances in the study of Brazzein. *J China Food Addit* (中国食品添加剂),2003,6:11-23.
- 7 Shi Y(史勇),Zhang MJ(张明军),Zhang Y(张英),*et al.* Construction of yeast expression system of sweet protein Brazzein. *J Jilin Agric Univ*(吉林农业大学学报),2010,1:43-46.
- 8 Assadi-Porter FM, Aceti DJ, Markley JL. Sweetness determinant sites of Brazzein, a small, heat-stable, sweet-tasting protein. *Arch Biochem Biophys*,2000,376:259-265.
- 9 Gao YQ(高逸群). Construction of Brazzein expression system in *Escherichia coli*. Changchun: Jilin University (吉林大学), MSc. 2006.
- 10 Zhao HL(赵红玲),Chen JC(陈劲春). Preliminary study on the expression of Brazzein in pichi yeast. *J Beijing Univ Chem Technol, Nat Sci Ed*(北京化工大学学报),2005,2:14-16.
- 11 Wang Y(王燕). Agrobacterium-mediated transformation of sweet protein Brazzein gene in *Fragaria × ananassa* Duch. 'AKIHIME'. Nanjin: Nanjin Agricultural University (南京农业大学), MSc. 2012.
- 12 Zhu DY(朱道圩),Qin YH(秦永华),Zhang SL(张上隆). Expression of thaumatin in the Horticultural Plant. *Chin J Cell Biol*(细胞生物学杂志),2005,5:535-538.
- 13 He GY(何国庆),Li CL(李春丽),Ruan H(阮晖),*et al.* Synthesis of the mosaic gene composed of human  $\beta$ -defensin-3 (hBD3) and Plant Brazzein and its expression in *Escherichia coli*. *J Agric Biotechnol*(农业生物技术学报),2005,2:217-220.
- 14 Li CL(李春丽),Xu XL(徐雪丽),Zheng ZY(郑振宇),*et al.* Optimizing conditions for the expression of Human  $\beta$  Defensin 3 and des-pGlu1-Brazzein in *escherichia coli* and analysis of their activity. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报),2008,3:485-490.
- 15 Tang LJ(唐丽杰),Ou D(欧笛),Ge JW(葛俊伟),*et al.* Construction of recombinant *Lactococcus lactis* expressing porcine transmissible gastroenteritis spike glycoprotein and analysis of immunogenicity. *Acta Microbiol Sin*(微生物学报),2007,2:340-345.
- 16 Li YJ, Ma GP, Li GW, *et al.* Oral vaccination with the porcine rotavirus VP4 outer capsid protein expressed by *Lactococcus lactis* induces specific antibody production. *J Biomed Biotechnol*,2010,2010:1-9.