



牛肉风味强化肽 (BMP) 表达载体的构建

王艳萍¹, 高文¹, 侯建华², 孟琦¹

(1. 天津市食品营养与安全重点实验室, 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457;

2. 百泰生物药业有限公司, 北京 100176)

摘要: 牛肉风味强化肽 (Beefy Meaty Peptide, BMP) 最初是从牛肉木瓜蛋白酶的水解物中分离得到的八肽, 它与味精和盐具有较好的协同作用, 可以呈现出牛肉风味. 为了能够大量、廉价地得到这种风味小肽物质, 本文根据毕赤酵母密码子偏爱性设计出 4 拷贝头尾相连的 BMP 表达基因, 并将其进行体外串联, 得到 8 拷贝、12 拷贝和 16 拷贝的 BMP 表达基因, 将其插入到表达载体 pPIC9, 从而得到 4 种不同的毕赤酵母的表达载体.

关键词: 牛肉风味强化肽; 载体构建; 串联基因

中图分类号: Q 819 文献标识码: A 文章编号: 1672-6510 (2008) 03-0016-05

Construction of Beefy Meaty Peptide Expression Vector

WANG Yan-ping¹, GAO Wen¹, HOU Jian-hua², MENG Qi¹

(1. Tianjin Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China; 2. Biotech Pharmaceutical Co., Ltd., Beijing 100176, China)

Abstract: The octapeptide beefy meaty peptide (BMP) is considered a savory seasoning in previous literatures. It was isolated from beef digested by Papain. BMP has better flavor cooperating with salt or monosodium glutamate (MSG). In order to obtain plenty of cheap BMP expression genes, tandem repeats of 4 copies BMP genes was designed according to the optimal codons of *Pichia pastoris*. The small segments were linked by T4 DNA ligase, and then 8 copies, 12 copies and 16 copies BMP expression genes were gained. They were inserted into the expression vector pPIC9 to form 4 different expression vectors of *P. pastoris*.

Keywords: beefy meaty peptide; vector construction; tandem genes

1978年, Yamasaki^[1]将牛肉用木瓜蛋白酶水解后, 再将水解液经凝胶过滤层析和离子交换层析纯化, 获得一个具有美好风味的组分. 经鉴定其氨基酸序列为 Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala, 命名为牛肉风味强化肽 (Beefy Meaty Peptide, BMP).

Spanier等^[2]于1996年比较了合成的BMP与味精的呈味感官差异, 结果发现, BMP较味精有更强的风味感觉与口感. Wang等^[3]也比较了BMP在不同pH下的感官性质, 结果显示BMP在pH为6.5时显鲜味, 9.5时为咸味和甜味而在3.5时为酸味. Takashi等^[4]研究证明了肽的风味主要是其中的基本片段Lys-Gly和酸性片段Asp-Glu-Glu起主要作用. Wang等^[5]发

现BMP具有非常好的热稳定性, 因此在各种调味品中, BMP有作为香味增强剂的可能.

目前, 获得生物短肽的方法主要是化学合成和酶解, 但是酶解的副反应多, 容易形成苦味肽, 提纯难度大. 而化学合成的方法存在成本高, 产量低等不利因素, 使得BMP很难大量生产, 尚未形成工业化生产. 因此, 寻找专一性强、成本低的方法迫在眉睫, 而利用目前分子生物学技术生产BMP, 在国内还没有报道. 欧洲专利^[6]报道了人工合成BMP基因, 然后把BMP基因克隆到具有信号肽识别序列的载体pNS2, 最后分别在大肠杆菌中融合表达, 以及在酵母中分泌表达. 但其产量低, 不能达到工业生产的标准.

收稿日期: 2008-01-15; 修回日期: 2008-03-25

基金项目: 天津市科技发展计划项目 (国际合作) (05YFGHHZ00200)

作者简介: 王艳萍 (1962—), 女, 天津人, 教授, 博士生导师.

基因重组技术是目前体外大量制备多肽的研究热点之一. 对于一些小分子的多肽, 构建单拷贝的表达基因在表达时容易被宿主蛋白酶降解丢失, 且不易纯化、产量低, 所以构建多拷贝的小肽表达基因是目前提高表达产量的主要手段, 而且应用一种高效的构建多拷贝串联小分子肽的表达基因成为一种需求. 因此, 本文采用同尾酶连接串联的方法构建多拷贝串联 BMP 基因, 通过分子操作技术, 构建 BMP 多拷贝串联基因表达载体 pPIC9-BMP.

1 材料与方

1.1 材料

Escherichia coli DH5 α 和表达载体 pPIC9 由本实验室保存. T4 DNA 连接酶、限制性内切酶, 大连宝生物公司; Taq PCR Mixmaster, 天为时代公司; 碱性磷酸酶, TOYOBO 公司; DNA 片段回收试剂盒, 上海生工公司; 其他试剂均为国产分析纯. 实验中设计的单链引物, 由奥科公司提供合成产品, 双链 DNA 的合成由大连宝生物公司完成.

1.2 方法

1.2.1 合成含有同尾酶的双链BMP表达基因

根据毕赤酵母密码子偏爱性^[7], 设计了在毕赤酵母中可以高效表达翻译BMP的DNA序列: 5'-AAG GGT GAC GAG GAA TCT TTG GCT-3', 为了增加表达产量, 并且简化基因体外操作难度, 将操作片段设计为含有 4 拷贝BMP的表达基因片段, 其中 4 拷贝的BMP表达基因头尾相连, 每个表达片段之间不含

其他序列. 在 4 拷贝 BMP 表达基因的上游位置加入 *Xho* I 限制性酶切位点, 下游位置加入 *Sal* I 限制性酶切位点, 这两个酶为同尾酶, 可以在体外进行串联, 产生更长的拷贝片段; 目的基因片段的 *Xho* I 限制性酶切位点的上游位置加入 *EcoR* I 限制性酶切位点, *Sal* I 限制性酶切位点的下游位置顺序加入 6 \times His 编码基因、TAA 终止密码子和 *Not* I 限制性酶切位点, 最终得到基因序列: 5'-GAATTCCTCGAGAAGG GTGACGAGGAATCTTTGGCTAAGGGTGACGAGG AATCTTTGGCTAAGGGTGACGAGGAATCTTTGG CTAAGGGTGACGAGGAATCTTTGGCTGTCGACC ACCACCACCACCACCCTAAGCGGCCGC-3'.

设计的包含 143 个碱基对的 4 拷贝 BMP 表达基因的双链 DNA 由大连宝生物公司合成, 并按照要求将合成的双链 DNA 片段连接于 pMD18 simple 载体上, 并由 *E.coli* JM109 作为宿主菌携带该种质粒.

1.2.2 多拷贝BMP表达基因的串联

将 pMD18 simple-4BMP 用 *Xho* I 进行单酶切, 得到线性载体 pMD18 simple-4BMP/*Xho* I. 使用碱性磷酸酶将上述的 pMD18 simple-4BMP/*Xho* I 去磷酸化, 防止载体自连. 再将 pMD18 simple-4BMP 质粒用 *Xho* I 和 *Sal* I 进行双酶切, 得到 106 bp 的 DNA 小片段 4BMP/*Xho* I/*Sal* I. 再将上述纯化的 pMD18 simple-4BMP/*Xho* I 和 4BMP/*Xho* I/*Sal* I 小片段用 T4 DNA 连接酶进行连接. 图 1 为此多串联拷贝的操作示意图.

将连接产物通过电击转化, 转入 *E.coli* DH5 α 感受态细胞中. 在含 50 μ g/mL Amp 的 LB 固体平板上, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养过夜 (12~14 h) 后挑选阳性转化子.

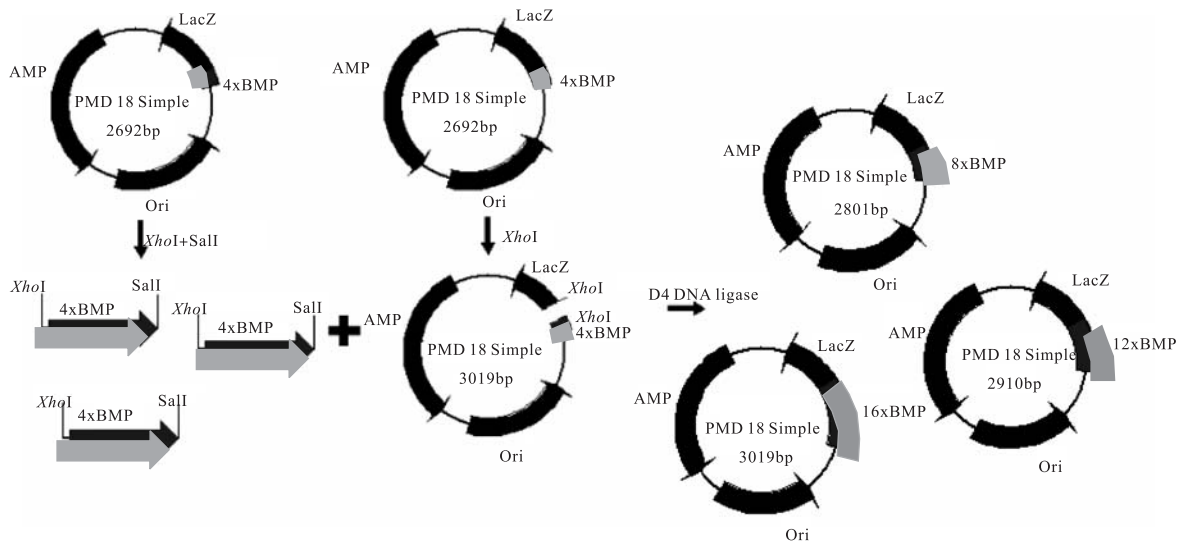


图 1 4 \times BMP 多串联拷贝操作示意图

Fig. 1 Tandem construction of 4 \times BMP

1.2.3 pMD18 simple-xBMP 载体的验证

命名 1.2.2 中挑选出转化子 (即可以在 50 $\mu\text{g/mL}$ Amp 的 LB 固体平板上生长的菌株) 分别为 pMD18 simple-BMP1、pMD18 simple-BMP2、pMD18 simple-BMP3、... .., 将这些挑取的转化子扩大培养后, 分别提取其质粒, 再分别用 *Xho* I 和 *Sal* I 进行双酶切, 电泳检测是否有大于 106 bp 的片段包含于两个酶切位点间. 因为 4 拷贝 BMP 表达基因大小为 106 bp, 如果有片段的大小为 106 bp 的倍数, 即可得到约为 200 bp、300 bp 或者更大片段的酶切产物, 那么可以断定有大于 4 拷贝的 BMP 插入到原表达载体中. 选出的阳性转化子再用 *Eco*R I 和 *Not* I 进行双酶切, 验证 4 BMP/*Xho* I /*Sal* I 小片段插入 pMD18 simple-4 BMP 载体的方向. 因为 4 BMP/*Xho* I /*Sal* I 小片段的两端分别为 *Xho* I 和 *Sal* I 的黏性末端, 插入方向是随机的, 如果 *Xho* I 和 *Sal* I 两个黏性末端连接, 那么该位点即被突变, 既不被 *Xho* I 识别, 也不被 *Sal* I 识别. 如果 4 BMP/*Xho* I /*Sal* I 小片段的插入方向为反向, 则突变的酶切识别位点的位置与正向插入的位置不同. 正向插入时, *Xho* I 和 *Sal* I 在每 4 拷贝 BMP 单体之间的位点均被突变, 只有整个串联体的两端可以被识别; 如果是反向插入, 那么在每 4 拷贝 BMP 单体之间的位点没有被突变, 整个串联体会被切段, 因此, 通过不同的双酶切则可以判断 4 BMP/*Xho* I /*Sal* I 小片段插入的方向, 以及插入的数量.

1.2.4 多拷贝 BMP 表达载体 pPIC9-BMP 的构建及验证

将不同的 pMD18 simple-BMP 载体用 *Not* I 和 *Eco*R I 进行双酶切, 得到的小片段与 *Not* I 和 *Eco*R I 处理过的 pPIC9 的载体连接, 并将连接产物通过电击转化, 转入 *E.coli* DH5 α 感受态细胞中. 在含 50 $\mu\text{g/mL}$ Amp 的 LB 固体平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养过夜 (12~14 h) 后挑选阳性转化子. 阳性转化子的质粒 pPIC9-BMP 通过 PCR 鉴定其连接的正确性. 使用的引物为通用引物 5'AOX1 和 3'AOX1.

1.2.5 琼脂糖凝胶电泳^[8]

称取 0.24 g 琼脂糖, 加入 30 mL 的 Tris-乙酸电泳缓冲液, 制备成 8 g/L 的凝胶. 电泳条件为恒压 8 V/cm, 电泳 50 min 后 EB 染色, 紫外灯下观察.

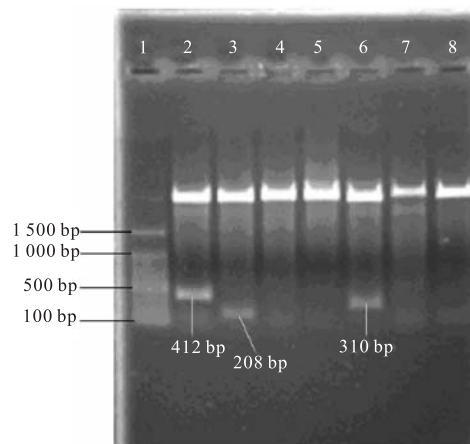
2 结果

2.1 多拷贝 BMP 表达基因的串联

将回收的 106 bp DNA 片段与 pMD18 simple-

4 BMP 载体连接后选择不同的转化子, 用 *Xho* I 和 *Sal* I 双酶切各个转化子的质粒, 图 2 是 7 株不同转化子的 *Xho* I 和 *Sal* I 双酶切电泳图.

从图 2 可以看出, 1、2、6 号转化子分别被切出了约 400 bp、200 bp 和 300 bp 大小的 DNA 片段, 这与理论值 412 bp、208 bp 和 310 bp 一致, 说明这三株转化子质粒很可能包含有正向插入的多串联 BMP 表达基因. 因此选择 1、2、6 号转化子质粒用 *Eco*R I 和 *Not* I 进行双酶切作进一步验证.

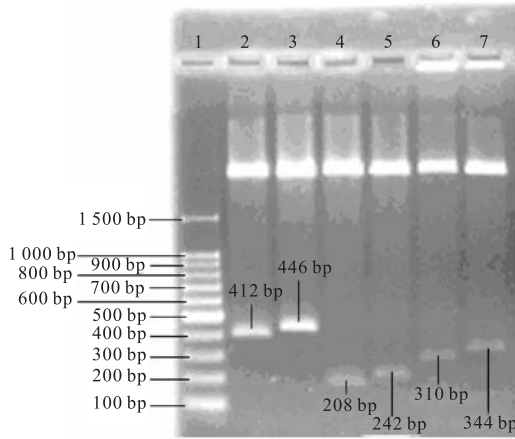


1. 100 bp DNA 标样; 2—8. 分别为 1、2、3、4、6、7、8 号转化子质粒的 *Xho* I 和 *Sal* I 双酶切泳道

图 2 多拷贝 BMP 表达载体的 *Xho* I 和 *Sal* I 双酶切电泳图
Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of tandem repeat BMP digested by *Xho* I and *Sal* I

图 3 为 *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切 1、2、6 号转化子质粒的电泳图谱, 并与 *Xho* I 和 *Sal* I 双酶切结果对比, 充分验证转化子基因串联的正确性.

从图 3 可以看出, 用 *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切 1、2、6 号转化子得到的 DNA 片段大小分别符合理论值. 理论上含 8 拷贝 BMP 表达基因的克隆载体, 用 *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切后得到的为 242 bp 大小的 DNA, 用 *Xho* I 和 *Sal* I 双酶切后得到的 DNA 片段大小为 208 bp; 含 12 拷贝 BMP 表达基因的克隆载体, 用 *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切后得到的 DNA 片段大小为 344 bp, 用 *Xho* I 和 *Sal* I 双酶切后得到的 DNA 片段大小为 310 bp; 含 16 拷贝 BMP 表达基因的克隆载体, 用 *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切后得到的 DNA 片段大小为 446 bp, 用 *Xho* I 和 *Sal* I 双酶切后得到的 DNA 片段大小为 412 bp. 这就表明, 选出的 1、2、6 号转化子分别是含有 16、8、12 拷贝 BMP 表达基因正向串联的克隆载体.



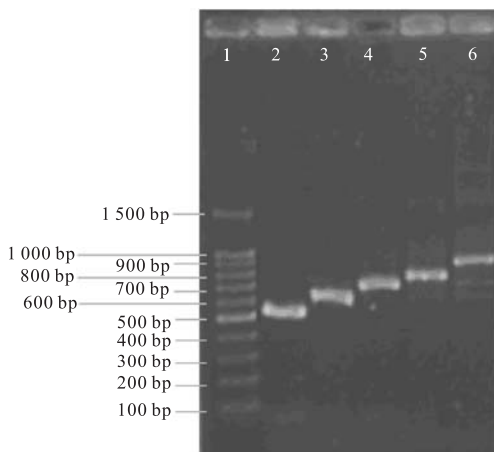
1. 100 bp DNA 标样; 2,4,6. 分别为1号、2号和6号转化子的 *Xho* I / *Sal* I 双酶切结果; 3,5,7. 分别为1号、2号和6号转化子的 *Eco* R I / *Not* I 双酶切结果

图3 1、2、6号转化子的 *Xho* I / *Sal* I 和 *Eco* R I / *Not* I 双酶切验证图

Fig. 3 Plasmid of 1,2,6 transformants digested by double enzyme

2.2 多拷贝 BMP 表达载体 pPIC9-BMP 的构建及验证

将上述1、2、6号转化子的质粒和原始的 pMD18 simple-4BMP 分别用 *Eco* R I 和 *Not* I 双酶切后得到16拷贝、8拷贝、12拷贝和4拷贝的DNA目的片段,再分别与经 *Eco* R I 和 *Not* I 双酶切的 pPIC9 表达载体连接,将连接产物通过电击转化,转入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中,经 LB-Amp 50 μ g/mL 抗性平板 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 12 h 后,筛选出阳性转化子,通过 PCR 进行验证. 图4为携带 pPIC9-BMP 的不同转化子的 PCR 验证.

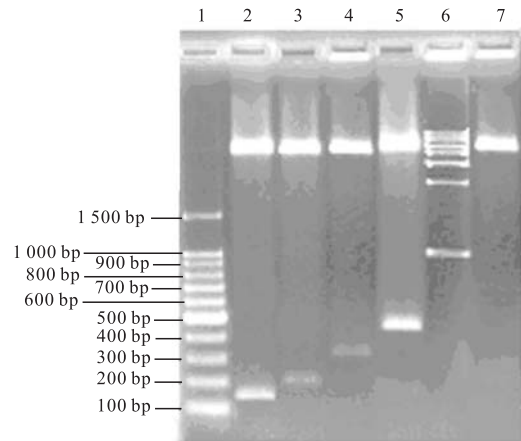


1. 100 bp DNA 标样; 2—6. 分别是 pPIC9、pPIC9-4BMP、pPIC9-8BMP、pPIC9-12BMP 和 pPIC9-16BMP 的 PCR 结果

图4 含 pPIC9-BMP 质粒的 PCR 验证图

Fig. 4 PCR of pPIC9-BMP

从图4可以看出,携带 pPIC9-BMP 的不同转化子以 5'AOX1 和 3'AOX1 通用引物经 PCR 后可以分别得到与理论相符的 640 bp、740 bp、840 bp 和 940 bp 大小的 DNA 克隆片段,因为引物所包含的片段自身大小约为 500 bp (即载体 pPIC9 的 PCR 片段),加上外源片段的插入后可得到与理论值大小相符的片段. 挑选出的阳性转化子,提取质粒使用 *Eco* R I 和 *Not* I 双酶切,能够再次重新得到多拷贝 BMP 的 DNA 片段(图5),充分证明多拷贝 BMP 表达基因成功插入到 pPIC9 表达载体的 *Eco* R I 和 *Not* I 之间的多克隆位点.



1,6. 分别为 100 bp、1 000 bp DNA 标样; 2,3,4,5,7. 分别为 pPIC9-4BMP、pPIC9-8BMP、pPIC9-12BMP、pPIC9-16BMP、pPIC9 的 *Eco* R I 和 *Not* I 双酶切结果

图5 pPIC9-BMP 质粒的双酶切验证图

Fig. 5 Agarose gel electrophoresis of pPIC9-BMP digested by *Eco* R I and *Not* I

从图5可以看出,将构建的不同表达载体 pPIC9-4BMP、pPIC9-8BMP、pPIC9-12BMP 和 pPIC9-16BMP 以 *Eco* R I 和 *Not* I 双酶切后分别能够得到 140 bp、242 bp、344 bp 和 446 bp 的与理论值相符的 DNA 片段,由此可以证明, pPIC9-4BMP、pPIC9-8BMP、pPIC9-12BMP 和 pPIC9-16BMP 已经构建成功.

选取 pPIC9-16BMP 使用 3'AOX1 引物进行测序,进一步证明目的基因的核苷酸序列的完全正确性.

根据 pPIC9 的多克隆位点图谱以及最初设计的 BMP 表达基因,从测序顺序中可以找出完全对应的互补序列. 因此,充分证明了 pPIC9-4BMP、pPIC9-8BMP、pPIC9-12BMP、pPIC9-16BMP 的构建成功. 可以将构建好的载体用于毕赤酵母的重组,进行后续的克隆表达实验. 上述克隆载体的成功构建为构建表

达多拷贝 BMP 毕赤酵母提供了实验基础,是构建重组毕赤酵母的重要环节。

3 讨论

为了表达牛肉风味肽,实验采用体外合成双链 4×BMP DNA 表达基因. 并通过同尾酶酶切,进行体外串联. 通过酶切、PCR 和 DNA 测序等方法验证,最终确定得到了 4 种不同的表达载体 pPIC9-4BMP、pPIC9-8BMP、pPIC9-12BMP、pPIC9-16BMP。

本实验构建的多串联拷贝基因构建中基因之间没有接头,因此表达产物也是由串联的 BMP 单体组成. 根据 Paul^[9]报道,对 T (thaumatin) 蛋白和 M (monellin) 蛋白修饰后,产生了新的风味蛋白,在 T II 蛋白中存在一个风味活性区域 (19~26 段氨基酸序列),这段序列被 BMP 代替后表达的蛋白具有牛肉的风味. Cagan^[10]也报道了 BMP 类似 monellini I 亚基中 4~10 区域中的氨基酸片段,从而推测 BMP 替换 monellini I 亚基后能够与味觉受体相互作用. 由此看出, BMP 的呈味特性主要由其序列形成的不同基团决定,根据该专利实验结果推测,本实验构建的串联 BMP 很可能具有呈牛肉风味的特性。

pPIC9 是毕赤酵母 GS115 的表达载体之一,而巴斯德毕赤酵母表达系统是近年来发展迅速、应用广泛的一种真核表达系统,具有高效表达、稳定性高、适合高密度发酵等优点. 因此,利用基因重组技术将 BMP 表达基因重组进毕赤酵母很可能实现大量生产 BMP 的目的,为大量生产 BMP 提供理论前提. 而基因重组的重点是表达基因的获得和表达载体的构建。

本文通过合理的设计,获得的 4 种不同的表达载体可以进行进一步的体外操作,引入 6×his 表达基因,可以使蛋白产物通过镍柱进行纯化,为后期工作的简化提供了条件. 目的基因两端的 EcoR I 和 Not I 酶切位点也可应用于其他的毕赤酵母的商品化表达载体,实现构建不同的毕赤酵母工程菌的目的,

从而提高目的产物的产量. 因此,该载体为后期工程表达菌体的构建奠定了实验基础。

参 考 文 献:

- [1] Yamasaki Y, Maekawa K A. Peptide with delicious taste [J]. *Agric Biol Chem*, 1978, 42: 1761—1765.
- [2] Spanier A M. Contribution of a Naturally Occurring: Nonvolatile Peptide to Beef Flavor [M]. USA: Allured Publ Co Carol Stream, 1996: 47—57.
- [3] Wang K, Maga J A, Bechtel P J. Taste propeptide and synergisms of beefy meaty peptide [J]. *Food Sci*, 1996, 61: 837—839.
- [4] Takashi Nakata, Masatoshi Takahashi, Masaru Nakatani, et al. Role of basic and acidic fragments in delicious peptides (Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala) and the taste behavior of sodium and potassium salts in acidic oligopeptides [J]. *Biosci Biotech Biochem*, 1995, 59 (4): 689—693.
- [5] Wang K, Maga J A, Bechtel P J. Stability of beefy meaty peptide to pasteurization and sterilization temperatures [J]. *Lebensm Wiss Technol*, 1995, 28: 539—542.
- [6] Lerch, Konrad. Cloning, expression and production of tasty peptides: European patent, 0832972 [P]. 1998-04-01.
- [7] Zhao Xiang, Huo Keke, Li Yuyang. Synonymous codon usage in *Pichia pastoris* [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2000, 16 (3): 308—311.
- [8] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1999: 309.
- [9] Scharpf Jr LG, Bolen PL, Cihak PL, et al. Flavor active modified thaumatin and monellin and methods for their production and use: US, 6420527 [P]. 2002-07-16.
- [10] Cagan R H. Peptide interactions with taste receptors: overlap in taste receptor specificity [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 1984, 40 (8): 843—844.