

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00663

## 甜蛋白 *Brazzein* 基因在番茄果实中的特异表达

尹涛<sup>1</sup>, 卢虹玉<sup>2</sup>, 张上隆<sup>1</sup>, 刘敬梅<sup>3</sup>, 陈大明<sup>1,4</sup>

1. 浙江大学园艺系, 杭州 310029;
2. 广东海洋大学食品科技学院, 湛江 524088;
3. 北京市蔬菜研究中心, 北京 100089;
4. Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center at Johns Hopkins, USA

**摘要:** 西瓜(*Citrullus vulgaris* S.)来源的 *AGPLI* 启动子在番茄(*Lycopersicon esculentum* L.)果实中具有较强的特异性驱动功能。将该启动子与甜味蛋白基因 *Brazzein* 融合构建植物表达载体, 通过根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导法成功地进行了对番茄的遗传转化, 获得转化植株。组织化学法、PCR 特异扩增、Southern 杂交分析及 RT-PCR 检测, 表明 *Brazzein* 基因已整合到转基因番茄植株基因组中并且稳定表达。通过 *AGPLI* 果实特异启动子的调控, 在不改变果实其他性状的前提下提高了番茄果实甜味品质, 并为甜蛋白的生产提供经验。

**关键词:** 番茄; 甜蛋白基因 *Brazzein*; 遗传转化; 果实特异; *AGPLI* 启动子

## Fruit-specific expression of sweet protein *Brazzein* in transgenic tomato plants

YIN Tao<sup>1</sup>, LU Hong-Yu<sup>2</sup>, ZHANG Shang-Long<sup>1</sup>, LIU Jing-Mei<sup>3</sup>, CHEN Da-Ming<sup>1,4</sup>

1. Department of Horticulture, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;
2. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;
3. Beijing Vegetable Research Center, Beijing 100089, China;
4. Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center at Johns Hopkins, USA

**Abstract:** The *AGPLI* (ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit 1) promoter from watermelon (*Citrullus vulgaris* S.) has proved to exhibit fruit-specific expression patterns in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). A plant expression vector harboring sweet-taste protein, *Brazzein*, directed by *AGPLI* promoter, was constructed and transferred into tomato plants through *Agrobacterium*-mediated transform methods. Histochemical staining assay, PCR screening, Southern blotting analysis and RT-PCR analysis showed that *Brazzein* gene was successfully integrated into the genome of transgenic tomato plants with stable expression. Sweet-taste fruits were produced under control of fruit-specific *AGPLI* promoter, whereas other parameters of fruit quality were largely unchanged.

**Keywords:** tomato; sweet protein *Brazzein*; genetic transformation; fruit-specific; *AGPLI* promoter

关于天然存在蛋白具有甜味的报道已有多年的历史。该类蛋白高甜度、低热量, 而且具有不易诱发病糖尿病、肥胖症等优点, 逐渐成为蔗糖等传统甜味物质的替代品, 其商业需求日益增长<sup>[1]</sup>。但提取自

收稿日期: 2008-11-27; 修回日期: 2008-12-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30671430)资助

作者简介: 尹涛(1978-), 男, 博士, 研究方向: 园艺植物分子生理与生物技术。E-mail: yintaoo@163.com

通讯作者: 张上隆(1933-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 园艺植物分子生理与生物技术。E-mail: shlzhang@zju.edu.cn

热带植物果实的天然甜蛋白产量有限, 远远不能满足人们的需求。因此, 利用基因工程技术将甜蛋白基因转入常见蔬菜中并使其表达, 用以提高可食用器官的甜味品质并生产大量甜味蛋白具有特别的研究意义。

目前人们已经从热带植物的果实中发现 Thaumatin、Monellin、Mabinlin、Pentadin、Curculin 和 Brazzein 等 6 种甜味蛋白<sup>[2~6]</sup>。其中, 甜蛋白基因 *Brazzein* 来源于热带植物 *Pentadiplandra brazzeana* B.<sup>[5]</sup>, 该基因编码蛋白由 54 个氨基酸残基组成, 分子量为 6.5 kDa, 其甜度是相同质量蔗糖的 500~2000 倍, 而且水溶性好, 80 °C 高温下处理 4 h 仍能保持甜味, 成为已知甜蛋白中最具应用前景的一种<sup>[6]</sup>。在玉米种子中表达 *Brazzein* 基因生产甜蛋白已有成功报道<sup>[7]</sup>。

番茄果实作为日常生活中一种重要的食用器官, 通过转基因技术改善果实品质已经有许多报道, 如改变果实硬度、提高营养成分含量等。在与品质改良相关的研究中多以提高类胡萝卜素含量或其他营养成分为主。在与增加甜度相关的研究中, 仍然以提高蔗糖等碳水化合物成分为主<sup>[8,9]</sup>。本研究中, 我们根据甜蛋白高甜度、低热量的特点, 利用果实特异性启动子 *AGPL1* 驱动 *Brazzein* 基因构建植物表达载体, 通过农杆菌介导法对番茄进行遗传转化, 使该基因在番茄果实中定向表达, 在不明显影响其他性状的前提下, 获得在果实中特异表达的转基因番茄植株。为改善番茄果实风味品质提供了新思路, 又为植物生产甜蛋白的基因工程作出探索。

## 1 材料和方法

### 1.1 质粒和菌株

*Brazzein* 基因根据文献报道人工合成<sup>[10]</sup>。pBI221 质粒含 CaMV 35S 启动子驱动的 *gusA* 基因和 Nos 终止子, pBI221-B 质粒含 CaMV 35S 启动子驱动的 *Brazzein* 基因和 Nos 终止子, 重组质粒 pBSPA-12 含有果实特异调控功能的 *AGPL1* 启动子 1 197 bp 片段, 根癌农杆菌 GV3101 由本实验室保存甘油菌; 番茄品种 (*Lycopersicon esculentum*) 由香港中文大学 Samuel Sun 教授提供。

### 1.2 无菌苗的获得及小植株的诱导

番茄转化采用子叶盘转化法<sup>[11]</sup>。番茄种子用 10% NaClO 灭菌 20 min, 无菌水冲洗 3 次, 播种于 MS 培养基上, 黑暗下 26 °C 萌发。4 d 后移至光下待子

叶完全展开。子叶切去尖端和基部, 剩余部分切成 0.5 cm<sup>2</sup> 小片置于 MS1 培养基上 (MS+2 mg/L ZT+0.05 mg/L IAA+蔗糖 30 g/L, pH 5.8, 琼脂 0.4%), 于 26 °C 预培养 2 d。

收集培养至对数生长期根癌农杆菌, 用 MS 液体培养基重新悬浮。预培养后的外植体浸入菌液中 30 min, 放入共培养培养基上 (MS+2 mg/L ZT+0.05 mg/L IAA+蔗糖 30 g/L, pH 5.8, 琼脂 0.4%)。2 d 后转入筛选培养基上 (MS+2 mg/L ZT+0.05 mg/L IAA+75 mg/L Kan+400 mg/L Car+蔗糖 30 g/L, pH 5.8, 琼脂 0.4%)。20 d 后转化的外植体出现小芽分化, 将带叶柄的芽切下放入生根培养基 (MS+0.1 mg/L IAA+75 mg/L Kan+400 mg/L Car+蔗糖 30 g/L, pH 5.8, 琼脂 0.4%), 20 d 小植株转入营养土中培养, 植株长至 30 cm 后炼苗移栽。

### 1.3 基因组 DNA 提取及 PCR 扩增

从卡那霉素抗性植株上剪取叶片, CTAB 法提取基因组 DNA。根据 *gusA* 基因序列设计引物进行 PCR 检测, 引物序列为 *gusA*-sense: 5'-GTCAGTGG CAGTGAAGGG-3'; *gusA*-anti: 5'-TGGTATCGGTG TGAGCGT-3'。

### 1.4 GUS 组织化学染色

GUS 染色的材料于染色缓冲液 [GUS 染色液: 50 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.0, 0.5% Triton X-100, 10 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 0.5 mmol/L K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 和 2 mmol/L X-Gluc] 中抽真空 15~20 min。37 °C 温育 16~18 h, 染色材料于固定液 (固定液: 60% 无水乙醇, 5% 冰乙酸, 3.7% 多聚甲醛) 中固定 2 h, 然后于 70% (v/v) 乙醇中脱色<sup>[12]</sup>。

### 1.5 转基因植株的 Southern blotting 分析

Southern blotting 等方法参见分子克隆实验指南 (第三版)<sup>[13]</sup>; 基因组 DNA 由 *EcoR* 酶切过夜, *gusA* 基因片段和 *Brazzein* 基因为探针。

### 1.6 总 RNA 提取及 RT-PCR 检测

以绿熟期番茄果实为材料, Trizol 法提取总 RNA, Oligo-d(T) 进行反转录; 根据 *Brazzein* 基因设计特异引物进行检测, 引物序列为 sense: 5'-ATG GATAAATGTAAAAAAGT-3'; anti: 5'-CTAGTATT CGCAGTAGTCGC-3'。

## 1.7 果实提取液甜度检测

精确称取 5 g 转基因番茄成熟期果实研磨成匀浆, 去离子水定容至 50 mL, 以未转基因番茄植株的果实为对照, 分两组对样品进行甜度品尝鉴定, 重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 转化载体的构建

图 1 所示为 pBI121-12B 质粒。 *Brazzein* 基因由 *AGPL1* 启动子 1 197 bp 片段驱动, 启动子两端分别具有 *Hind*III 和 *Xba* 酶切位点, 基因下游为 *Nos* 终止子。 *CaMV* 35S 启动子驱动 *gusA* 标记基因, *Nos* 启动子驱动 *npt* 筛选基因。图 2 为表达载体 pBI121-12B 质粒 3 个克隆的酶切鉴定。其中, *Hind* 和 *Pst* 酶切时以 *AGPL1* 启动子和 *Brazzein* 基因释放出 1.5 kb 片段, 与载体内部的 *Pst* 酶切位点共释放出 4 923 bp、1 947 bp 等条带。

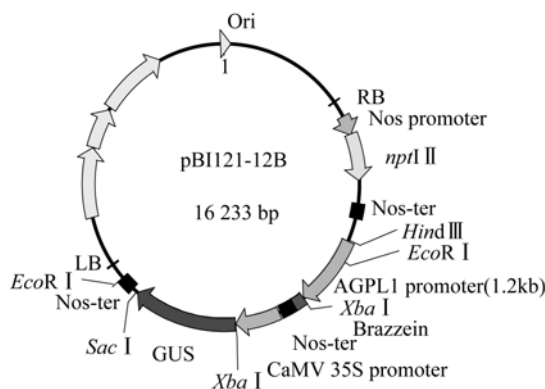


图 1 *AGPL1* 启动子驱动 *Brazzein* 基因的植物二元表达载体的构建

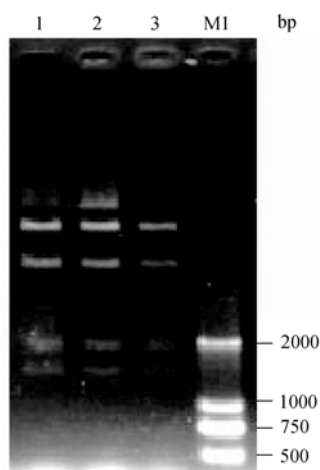


图 2 植物表达载体 pBI121-12B 质粒 DNA 的酶切鉴定  
1~3: *Hind* + *Pst* 双酶切鉴定; M1: DL2000 Marker。

### 2.2 转化苗的生长

番茄子叶外植体切成小段, 在根癌农杆菌中转化后于筛选培养基中培养, 20 d 后切口周围部分发生绿色或淡黄色愈伤, 并在切口处长出丛生芽。经过多次继代筛选, 未转化的丛生芽部分开始停止生长, 当转化的芽长至 1.5~2 cm 并带有明显茎段发生时, 将其切下移至含抗生素的培养基上诱导生根。阳性芽生根后迅速长成正常植株。当植株生长到 15~20 cm 时移到蛭石中培养, 适时炼苗移栽并进行检测。

### 2.3 转基因番茄的鉴定

#### 2.3.1 组织化学染色法检测

植物表达载体 pBI121-12B 携带有 *gusA* 报告基因, 因此可以用组织化学染色法进行初步检测。图 3 所示, 在未转基因番茄植株叶片中未见蓝色出现, 而在转化植株(图 3, A-E)的叶片中均有不同程度的蓝色, 说明外源基因 *gusA* 已经整合到番茄植株染色体中并进行了稳定表达, 判断为阳性转基因植株。

#### 2.3.2 转化番茄植株的 PCR 检测

取 *GUS* 检测为阳性的番茄植株的幼嫩叶片少许, 提取番茄基因组 DNA 作为 PCR 反应的模板, 利用 *gusA* 基因内部一对特异引物进行 PCR 扩增检测。根据图 4 的电泳结果可知, *GUS* 染色阳性植株可扩增出 551 bp 的特异条带, 而未转化的番茄植株中则不能扩增出相应条带。

#### 2.3.3 转化番茄植株的 Southern blotting 分析

对上述检测为阳性的转化植株提取 DNA 进行 Southern blotting 分析。从图 5 杂交结果可以看出, 转化植株与 *gusA* 基因 500 bp 片段杂交时均有杂交带出现, 而在未转基因番茄植株中未见明显杂交条带出现, 表明 *gusA* 报告基因已经整合到番茄基因组 DNA 中; 而以 *Brazzein* 基因为探针针对转化番茄进行 Southern blotting 分析时发现, *Brazzein* 基因已经整合到番茄基因组 DNA 中。而在不同株系中杂交条带出现的位置和数目也不相同, 表明在不同株系中目的基因的整合位置也不同, 而且部分以单拷贝形式存在, 可以将阳性转化植株进行下一步的验证。

#### 2.3.4 转化番茄果实的 RT-PCR 检测及甜度鉴定

将 Southern blotting 后鉴定的阳性转化果实提取总 RNA, 反转录后进行目的基因的 PCR 扩增。如

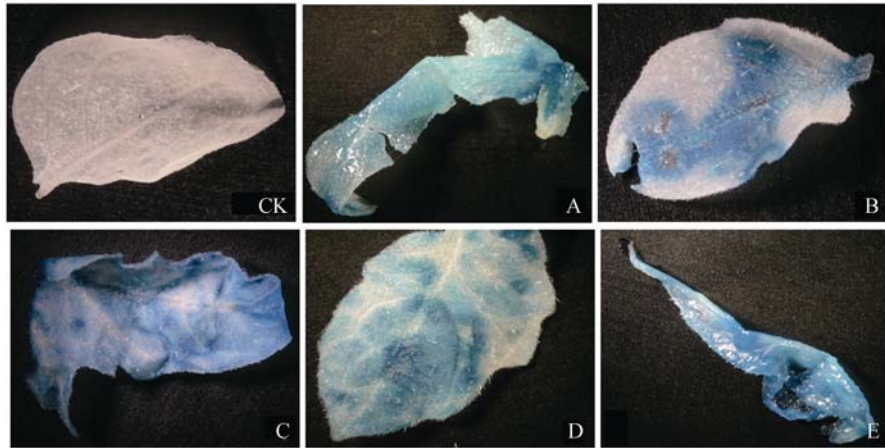


图 3 转化番茄植株叶片的 GUS 染色

A~E: 转化番茄植株叶片; CK: 未转基因番茄植株叶片。

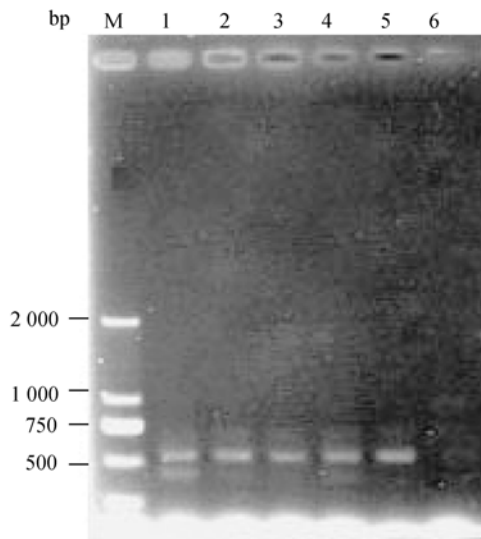


图 4 转化番茄植株的 PCR 检测

M: DL2000 Marker; 1~5: 转基因番茄植株; 6: 未转基因番茄植株。

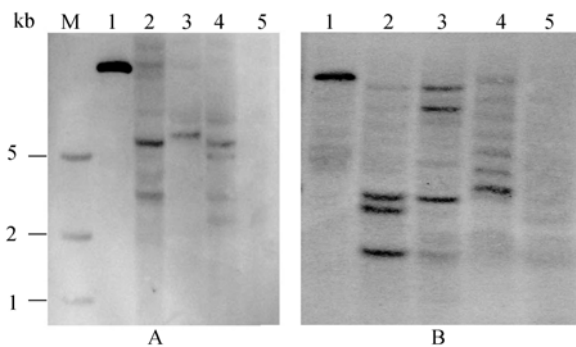


图 5 转化番茄植株的 Southern blotting 分析

A: *gusA* 为探针; B: *Brazzein* 基因为探针; M: Marker; 1: 线性化载体 pBI121-12B 为阳性对照; 2~4: 转化番茄植株; 5: 未转基因番茄植株。

图 6 所示, 在阳性植株中都有 177 bp 的目的条带出现, 而未转基因番茄果实中则未见条带出现。因此判断 *Brazzein* 基因整合到番茄基因组中, 并开始番茄果实中稳定表达。

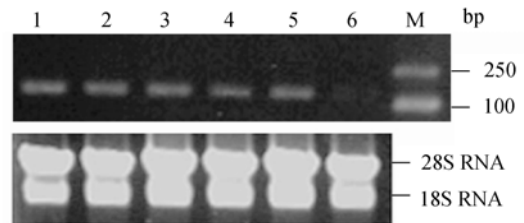


图 6 转化番茄果实的 RT-PCR 检测

M: DL2000 Marker; 1~5: 转基因番茄果实; 6: 未转基因番茄果实。

选取 RT-PCR 检测为阳性并且相同成熟度的番茄果实提取粗蛋白, 与未转基因番茄果实比较甜度。结果表明 5 个转化株系的番茄果实都有不同程度的甜味提高, 但甜度提高倍数较难测定。因此确定甜蛋白的产率, 及精确的甜度相关检测将是下一步工作内容。

### 3 讨论

甜蛋白作为一种天然的新型甜味剂, 甜度高、热量低, 又不易被细菌所利用, 所制成的食品适于糖尿病患者食用, 成为食品中营养性碳水化合物的替代品。因此, 研究甜蛋白基因在番茄中的表达, 可以探讨增加甜度、改善果实风味或生产甜味蛋白的可能性<sup>[7]</sup>。

利用生物手段改良果实品质、生产目的蛋白, 在近些年的植物基因工程中取得了显著进步。大量与提高果实品质相关的基因(如类胡萝卜素和类黄



酮含量等)相继转入到番茄等植物中并得到稳定表达<sup>[14]</sup>。但在目前基因工程中,为提高目的基因在植物体内的产率,多使用组成型强启动子。外源基因的组成型高效表达往往造成植物体内营养的大量消耗,对于植物的农艺性状也产生了不良的影响<sup>[15]</sup>。而特异性启动子能操纵目的基因在果实中的特定表达,为生产目的蛋白(如抗体、生物制药、口服疫苗等)应用开辟了广阔的前景<sup>[16]</sup>。

本实验中,我们应用的*AGPL1*启动子是从西瓜中克隆得到的ADP-葡萄糖焦磷酸化酶大亚基基因的启动子,已经证明能引导报道基因在番茄等果实中高效地定向表达,是一种新型的果实特异性启动子<sup>[17]</sup>。因此由该特异性启动子驱动*Brazzein*基因在果实内的定向高效表达,以求获得目的蛋白在果实内的高效积累。本实验的番茄转化植株经过组织化学染色、Southern blotting分析等对转化植株进行鉴定,表明该甜蛋白基因已经整合到番茄基因组中。对阳性株系的RT-PCR检测表明,在果实特异启动子的驱动下,只在转化果实中检测到了*Brazzein*基因的表达。在转化番茄植株与对照植株生长过程中,株高、叶片和果实外形等均未出现矮化、丛生、果实发育畸形等异常现象(资料未发表)。在此基础上对转化果实进行了甜度分析,初步鉴定果实的甜味品质与未转基因番茄果实相比获得了改善。但是,由于目前甜度测定方式主要为人工品尝法,具有较大的主观性,不同测定人之间的个体差异造成甜度测定结果的误差范围较大。因此,规范化甜味蛋白的测定程序还有待于进一步研究。

由果实特异 *AGPL1* 启动子驱动甜蛋白 *Brazzein* 基因在番茄中进行了遗传转化,结果表明该基因定向在果实中稳定表达,而且所获得的转化植株未见其他性状明显改变,为提高果实甜味品质、人工生产甜味蛋白做出了初步探索。

## 参考文献(References):

- [1] Faus I. Recent developments in the characterization and biotechnological production of sweet-tasting proteins. *Appl Microb Biotechnol*, 2000, 53(2): 145–151. [\[DOI\]](#)
- [2] de Vos AM, Hatada M, van der Wel H, Krabbendam H, Peerdeman AF, Kim S. Three-dimensional structure of thaumatin I, an intensely sweet protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82(5): 1406–1409.
- [3] Bartoszewski G, Niedziela A, Szwacka M, Niemirowicz-Szczytt K. Modification of tomato taste in transgenic plants carrying a thaumatin gene from *Thaumatococcus daniellii* Benth. *Plant Breed*, 2003, 122(4): 347–351. [\[DOI\]](#)
- [4] 崔洪志, 李敏, 徐琼芳, 郭三堆. 植物 monellin 甜蛋白基因的细菌化改造合成及其在大肠杆菌中的表达. *中国农业科学*, 1999, 32(1): 58–62.
- [5] Ming D, Hellekant G. Brazzein, a new high-potency thermostable sweet protein from *Pentadiplandra brazzeana* B. *FEBS Lett*, 1994, 355(1): 106–108. [\[DOI\]](#)
- [6] Hellekant G, Danilova V. Brazzein a small, sweet protein: discovery and physiological overview. *Chem Senses*, 2005, 30(Suppl.1): 188–189. [\[DOI\]](#)
- [7] Lamphear B, Barker DK, Brooks CA, Delaney DE, Lane JR, Beifuss K, Love R, Thompson K, Mayor J, Clough R, Harkey R, Poage M, Drees C, Horn ME, Streatfield SJ, Nikolov Z, Woodard SL, Hood EE, Jilka JM, Howard JA. Expression of the sweet protein brazzein in maize for production of a new commercial sweetener. *Plant Biotechnol J*, 2005, 3(1): 103–114. [\[DOI\]](#)
- [8] Park JI, Lee YK, Chung WI, Lee IH, Choi JH, Lee WM, Ezura H, Lee SP, Kim IJ. Modification of sugar composition in strawberry fruit by antisense suppression of an ADP-glucose pyrophosphorylase. *Mol Breed*, 2006, 17(3): 269–279. [\[DOI\]](#)
- [9] Amemiya T, Kanayama Y, Yamaki S, Yamada K, Shiratake K. Fruit-specific V-ATPase suppression in antisense-transgenic tomato reduces fruit growth and seed formation. *Planta*, 2006, 223(6): 1272–1280. [\[DOI\]](#)
- [10] Assadi-Porter FM, Aceti DJ, Cheng H, Markley JL. Efficient production of recombinant Brazzein, a small, heat-stable, sweet-tasting protein of plant origin. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 376(2): 252–258. [\[DOI\]](#)
- [11] McBride KE, Summerfelt KR. Improved binary vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol*, 1990, 14(2): 269–276. [\[DOI\]](#)
- [12] Rech P, Grima-Pettenati J, Jauneau A. Fluorescence microscopy: a powerful technique to detect low GUS activity in vascular tissues. *Plant J*, 2003, 33(1): 205–209. [\[DOI\]](#)
- [13] J.萨姆布鲁克, D.W.拉塞尔. 分子克隆实验指南. 第三版. 黄培堂等译. 北京: 科学出版社, 2002, 492–512
- [14] Lessard PA, Kulaveerasingam H, York GM, Strong A, Sinskey AJ. Manipulating gene expression for the metabolic engineering of plants. *Metabolic Engin*, 2002, 4(1): 67–79. [\[DOI\]](#)
- [15] Yin T, Zhang SL, Liu JM, Chen DM. Approaches to improve heterogeneous gene expression in transgenic plants. *Chin J Agr Biotechnol*, 2006, 3(2): 75–81. [\[DOI\]](#)
- [16] Rurf S, Hermann M, Berger IJ, Carrer H, Bock R. Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(9): 870–875. [\[DOI\]](#)
- [17] 吴韩英, 刘敬梅, 朱祝军, 杨信廷, 陈大明. 西瓜 *wml1* 5'端启动子区域对番茄的遗传转化及其转录调控功能研究. *实验生物学报*, 2003, 36(3): 226–232.