

奇甜蛋白基因在园艺作物中的表达

朱道圩* 秦永华¹ 张上隆¹

(河南农业大学林学院园艺学院园艺系, 郑州 450002; ¹ 浙江大学园艺系, 杭州 310029)

摘要 奇甜蛋白(thaumatin)是从非洲西部植物 *katemfe*(*Thaumatococcus daniellii* Benth)中取得到的几种关系相近的甜味蛋白的统称, 其中最主要的为奇甜蛋白 I 和奇甜蛋白 II。奇甜蛋白不仅甜度高, 而且具有低热量、安全无毒以及不易诱发糖尿病等优点。因此, 将奇甜蛋白基因转入园艺作物中并使之表达, 用以提高可食部分的甜味, 有其特别的研究意义。奇甜蛋白基因已先后在马铃薯、梨树、黄瓜、番茄等园艺作物得到表达, 但仍有一些问题需要解决。现从奇甜蛋白基因的克隆、测序与表达, 转基因果实的安全性检测, 甜度的感官评价, 甜味遗传特点以及奇甜蛋白抗真菌病害检验等几个方面综述了国内外研究进展, 并对今后的研究提出了建议。

关键词 甜味蛋白; 奇甜蛋白; 基因工程

植物甜味蛋白是从植物中发现的一类具有甜味的蛋白质, 日前从植物中已分离出的甜味蛋白有 7 种, 包括奇甜蛋白(thaumatin)、应乐果甜蛋白(monellin)、马槟榔甜蛋白(mabinlin)、喷塔汀(pentadin)、布鲁赛因(brazzein)、麦若可林(miraculin)和仙茅甜蛋白(curculin), 其中奇甜蛋白是研究最深入的一种。奇甜蛋白是从非洲西部植物 *katemfe* (*Thaumatococcus daniellii* Benth)中提取得到的几种关系相近的甜味蛋白的总称, 其中最主要的为奇甜蛋白 I 和奇甜蛋白 II。奇甜蛋白不仅甜度高, 而且具有低热量、安全无毒以及不易诱发糖尿病、肥胖症等优点, 所以作为天然甜味剂、增味剂已在多种人类食品和饲料中得到了广泛应用, 并在欧洲、美国和日本占有一定的市场。然而天然奇甜蛋白只能从植物果实中提取, 产量有限, 而且植物 *katemfe* 对生活环境要求苛刻, 引种不易成功, 不能满足人们对奇甜蛋白的大量需求。因此, 利用基因工程技术将奇甜蛋白基因转入园艺作物中并使之表达, 用以提高可食部分的甜味, 有其特别的研究意义。

1 甜味蛋白的种类和应用

迄今, 从植物中发现并分离出的甜味蛋白有 7 种, 其中 5 种(奇甜蛋白、应乐果甜蛋白、马槟榔甜蛋白、喷塔汀和布鲁赛因)为甜蛋白, 其蛋白质具有甜味; 麦若可林为矫味蛋白, 可诱发甜味; 另一种仙茅甜蛋白兼具甜蛋白和矫味蛋白的性质^[1,2]。随着生物技术不断提高, 已完成了 7 种甜味蛋白的

分离、鉴定和人工合成。7 种甜味蛋白中, 研究最多也较清楚的是奇甜蛋白和应乐果甜蛋白。奇甜蛋白是一种高甜度蛋白质, 浓度达 10^{-8} mol 即可感知其甜味^[3], 比等重量的蔗糖甜 3000 倍, 比等摩尔的蔗糖甜 1×10^5 倍^[4], 而且其甜味效应持续时间较长。除此之外奇甜蛋白还有增味作用, 可以作为增味剂使用^[5]。早在 20 世纪 80 年代就有商品化的奇甜蛋白产品 Talin。应乐果甜蛋白是从非洲西部植物(*Discoreophyllum cumminsii*)中提取得到的一种甜味蛋白。由于天然应乐果甜蛋白对热和酸处理比较敏感, 容易引起蛋白质变性, 使得应乐果甜蛋白的商品化生产发展缓慢。Penarrubia^[6]将应乐果甜蛋白基因分别通过转基因技术导入土豆和莴苣中, 表达量接近于总蛋白含量的 1%, 而且转基因样本具有甜味。

2 奇甜蛋白的来源、结构和性质

奇甜蛋白也是从西非热带雨林中一种竹芋科(Maraltaceae)灌木植物 *katemfe* (*Thaumatococcus daniellii* Benth) 中分离出来的。该蛋白质具组织表达特异性, 仅发现于该植物假种皮中。天然奇甜蛋白不仅甜度高, 而且具有欧亚甘草后味, 可用于烹饪、调制棕榈酒以及制作糖果。1972 年, 荷兰科学家 van der Wel^[7]首次从该植物浆果中提取到奇甜

收稿日期: 2004-12-16 接受日期: 2005-05-18

河南省自然科学基金(No.0111011700)

* 通讯作者。Tel: 0371-63555837, E-mail: zhudaoyu@yahoo.com

蛋白,后经过许多学者的大量研究,对其结构和性质已有了较深的认识。

天然存在的奇甜蛋白结构并不完全一致,系由一多基因家族编码的几种关系相近的蛋白质组成,其中最主要的为奇甜蛋白 I 和奇甜蛋白 II,这 2 种蛋白质一般各占假种皮干重的 20% 以上。已知的这些奇甜蛋白仅有 5 个或更少的氨基酸差异,且 N 末端均为丙氨酸。它们均由一条多肽链组成,含有氨基酸残基 207 个,分子量为 22 kDa。肽链分子内的 16 个半胱氨酸可形成 8 个链内二硫链,使得整个蛋白质分子在酸性条件下具有很好的热力学稳定性。在 pH 6.5 以下加热 30 min 对其甜度无影响,在 pH 2 时,即便在 80 °C 加热到 4 h,奇甜蛋白仍有甜味。

3 奇甜蛋白基因的克隆

Edens 等^[8]和 Ledebøer 等^[9]较早克隆了奇甜蛋白 cDNA (931 bp, 不具 polyA), 并对其进行了测序。他们的工作为奇甜蛋白基因工程奠定了基础,此后奇甜蛋白基因相继在大肠杆菌^[8]、酵母体系^[10]以及高等植物中得到表达。然而在酵母体系中表达产物均没有甜味,所得包含体在体外变性复性后才具有甜味,而且表达量低,也影响大规模生产的进行。为此,高音等^[11]采用大肠杆菌偏爱的密码子,合成 30 个寡聚脱氧核苷酸,在体外进行退火和连接合成奇甜蛋白 cDNA。他们将连接得到的 DNA 产物克隆到质粒 pBluescript-SK 上,转化大肠杆菌 DH5 α 细胞,进行 IPTG 诱导表达筛选,从 80 个克隆中最终获得了 2 个有诱导表达产物的克隆,并对其进行了 cDNA 全序列测定验证。此后,杨成丽等^[12]和赵琦等^[13]利用 DNA 重组技术,将植物甜蛋白奇甜蛋白基因克隆至植物表达载体 pBII21 中,为转化高等植物打下了基础。

4 奇甜蛋白基因在园艺作物中的表达

奇甜蛋白是第一个在转基因植物中表达的甜蛋白。Witty 等^[3]利用毛根转化技术成功地将奇甜蛋白 II 基因在马铃薯(*Solanum tuberosum* c.v. Iwa)中进行了表达。奇甜蛋白 II 基因先被克隆在植物穿梭载体 pWIT2 中的花椰菜花叶病毒启动子 CaMV35S 下游,将 pWIT2 与农杆菌 Ti 质粒一起接种在马铃薯愈伤组织中后,成功得到了含有奇甜蛋白 II 基因的再生植株。而且 0.1 g 的叶片、茎、毛根或愈伤组织样品

足够进行甜味检测。1992 年,杨美珠等^[14]将带有奇甜蛋白 II 基因和胭脂碱合成酶标记基因的 Ti 质粒导入马铃薯,获得大量转化植株。叶片抗性检测和胭脂碱(nopaline)检测表明外源甜蛋白基因已进入马铃薯基因组中。Dolgov^[15]将奇甜蛋白 II 基因导入温室苹果和梨树,结果表明愈伤组织中奇甜蛋白 II 较多而叶片较少。Lebedev 等^[16]利用 Unilever 克隆的奇甜蛋白 II cDNA 与 pBI121 构建双元载体,经农杆菌 CBE21 介导,成功地将奇甜蛋白基因导入梨树(品种 Burakovka)中。PCR 分析结果证实了该基因的导入,蛋白质转膜分析(Western blotting)证实了该基因的表达。奇甜蛋白 II 基因导入黄瓜的研究从 1996 年开始,已有多篇论文发表^[17-20]。Gajc-Wolska 等^[21]比较了转基因黄瓜与未转基因黄瓜品种,发现转基因黄瓜味甜,并在果实外观、果肉坚实度、果肉色泽、多汁性等方面,总体品质优于未转基因黄瓜品种。Bartoszewski 等^[22]利用农杆菌 LBA4404 介导,成功地将奇甜蛋白基因导入番茄,PCR 检测阳性重组率为 1.8%。

转基因食品的安全性是人们十分关注的问题。Kosieradzka 等^[23]用转基因奇甜蛋白 II 基因的黄瓜饲喂小鼠,以确定其食用安全性。研究结果表明,转基因黄瓜对小鼠的生长和生殖都没有影响。

5 甜度的感官评价

转基因样本甜度是否增加和是否与奇甜蛋白甜味一致是奇甜蛋白基因在园艺作物中的表达的主要依据,因此甜度的感官评价至关重要。

Szwacka 等^[20]利用两次评价法进行甜度感官评价:第一次由 4 人组成的评价小组品尝 1 g 转基因黄瓜样本和对照样本,并确定甜度等级;第二次仍由上述 4 人品尝用不同浓度奇甜蛋白水溶液处理的黄瓜对照样本,以确定转基因黄瓜样本甜味是否与奇甜蛋白甜味一致。评价小组人员选定的标准是能感知浓度 10^{-8} mol 奇甜蛋白的甜味。研究结果表明转基因黄瓜样本甜度增加并与奇甜蛋白甜味一致。

6 奇甜蛋白在转基因植株中的表达特点与甜味遗传

Szwacka 等^[20]研究了奇甜蛋白在转基因当代(T₀)、自交一代(T₁)、自交二代(T₂)黄瓜中的表达特点,发现奇甜蛋白 II 基因的表达水平与转入的 T-DNA 拷贝数无关,而且奇甜蛋白的积累与 mRNA

的表达水平也缺乏相关, 说明奇甜蛋白的积累在转录和翻译水平上均有制约机制。

Bartoszewski 等^[22]报道 18 个转基因番茄单株(T0)自交, 17 株产生种子(T1)。选取 3 个 T1 株系自交产生 T2, RNA 转膜分析(Northern blotting)和蛋白质转膜分析证实了该基因在 2 个 T2 株系中的转录与表达。甜度感官评价也证明这 2 个 T2 株系的果实较甜, 而且甜味后有一种特别味觉延绵于口中。

以上研究结果说明, 转基因植株所得到的甜味能够在后代遗传。

7 奇甜蛋白抗真菌病害研究

许多植物在病原诱导下会产生一些致病相关蛋白^[24], 其中第 5 类致病相关蛋白与奇甜蛋白有很高同源性却无甜味, 被称为类奇甜蛋白(Thaumatin-like protein), 并且链内亦具有二硫键。离体实验证明类奇甜蛋白对多种真菌具有明显抗性。金红等^[25]将类奇甜蛋白基因以农杆菌介导法成功地导入脱毒微型种薯“津引薯 8 号”, 转基因植株中类奇甜蛋白表达量显著高于对照组, 经晚疫病菌(*Phytophthora infestans*)游离孢子接种离体抗性分析, 转基因株系表现出对晚疫病的明显抑制作用和症状发生的延迟作用。既然奇甜蛋白与类奇甜蛋白同源性很高, 那么奇甜蛋白是否对真菌也具有抗性呢? Szwacka 等^[18,20]对此做了专门研究, 对比了转基因株与未转基因株叶片对黄瓜霜霉病的感染程度。研究结果表明, 13 株 T2 转基因植株中有 12 株表现对霜霉病的不同程度的抗性, 只有一株与对照株叶片发病状况相同。但进一步的研究发现 T2 转基因植株的抗病水平与其奇甜蛋白表达量没有相关关系, 目前还无法解释这一现象的原因。

8 小结

综上所述, 奇甜蛋白是植物甜蛋白中的一种, 它具有低热量、高甜度、安全无毒, 并可降解为人体所需的氨基酸等多种优点, 是一种新型甜味剂。而果实中的甜味来源于糖类, 多食易诱发糖尿病、肥胖症以及龋齿等疾病, 因此, 将奇甜蛋白基因转入园艺作物中并使之表达, 用以提高可食部分的甜味, 有其特别的研究意义。既能满足肥胖、糖尿病、高血压人群对甜味的嗜好, 又不致加重疾病。自 Edens 等^[8]克隆出奇甜蛋白 cDNA 后, 即开始了奇甜蛋白基因工程研究, 至今, 已实现在大肠

杆菌、酵母体系以及高等植物中的表达。近年来, 奇甜蛋白基因工程在园艺作物中也取得了显著进展, 奇甜蛋白基因先后在马铃薯、梨树、黄瓜、番茄等作物得到表达, 但仍有一些问题需要解决。

首先, 奇甜蛋白基因工程的研究还不广泛。特别是对无甜味的园艺作物应加大研究力度, 比如冬瓜、西葫芦、飞碟瓜、叶菜类等。

其次, 奇甜蛋白抗真菌病害研究还刚刚开始, 发表的论文很少, 尚需深入进行。

第三, 从前的研究中, 多用花椰菜花叶病毒 CaMV35S 启动子调控奇甜蛋白基因在转化组织中表达。但对食用部分主要是果实或种子的园艺作物而言, 今后应注重利用组织特异性启动子调控奇甜蛋白基因, 使其在果实或种子中集中表达。已利用的园艺作物组织特异性启动子有: 菜豆蛋白启动子(Ph/P)^[26]、番茄果实专一性启动子(2A12)^[27]以及猕猴桃果实特异表达猕猴桃素(actinidin)基因启动子等^[28,29], 可以保证外源基因在果实或种子中特异表达。

参考文献 (References)

- [1] 孔建强等. 遗传, 2003, 25: 232
- [2] 杨成丽等. 武汉植物学研究, 2001, 19: 153
- [3] Witty M. Nucleic Acids Res, 1989, 17: 3312
- [4] van Der Wel H et al. Eur J Biochem, 1980, 104: 413
- [5] van Der Wel H et al. Chem Senses Flavor, 1978, 3: 291
- [6] Penarrubia L et al. Biotechnology, 1992, 10: 561
- [7] van der Wel H et al. Eur J Biochem, 1972, 31: 221
- [8] Edens L et al. Gene, 1982, 18: 1
- [9] Ledebor A M et al. Gene, 1984, 30: 23
- [10] Lee JH et al. Biochemistry, 1988, 27: 5101
- [11] 高 音等. 首都师范大学学报(自然科学版), 2000, 21: 71
- [12] 杨成丽等. 华中师范大学学报(自然科学版), 2001, 35: 219
- [13] 赵 琦等. 首都师范大学学报(自然科学版), 2003, 24: 64
- [14] 杨美珠等. 植物学报, 1992, 34: 31
- [15] Dolgov SV. Molecular breeding of fruit trees. 'Plant Breeding: Sustaining the Future'. Abstracts of the XVIth EUCARPIA Congress, Edinburgh, Scotland, 10-14 September 2001
- [16] Lebedev VG et al. Acta Hort (ISHS), 2002, 596: 199
- [17] Szwacka M et al. Genet Pol, 1996, 37A: 126
- [18] Szwacka M et al. Thaumatin expression in transgenic cucumber plants. In: Altman A et al. (eds.) Proc. of IXth International Congress "Plant Biotechnology and In Vitro Biology in 21st Century", Jerusalem, Israel, June 14-19 1998, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 609
- [19] Malepszy S et al. Evaluation of transgenic cucumbers expressing the thaumatin gene. In: Hrazdina G (ed.) Use of Agriculturally Important Genes in Biotechnology, NATO Science Series, Amsterdam: IOS Press, 2000, 319: 131

- [20] Szwacka M *et al. Acta Physiol Plant*, 2002, **24**: 173
[21] Gajc-Wolska J *et al. Acta Hort* (ISHS), 2003, **604**: 449
[22] Bartoszewski G *et al. Plant Breed*, 2003, **122**: 347
[23] Kosieradzka I *et al. J Anim Feed Sci*, 2001, **10**: 7
[24] van Loon LC. *Plant Mol Biol*, 1985, **4**: 111
[25] 金 红等. *华北农学报*, 2001, **16**: 67
[26] Yu XH *et al. 植物学报*, 2000, **42**: 59
[27] Mao Z *et al. Chin Sci Bull*, 2002, **47**: 928
[28] Lin E *et al. Plant Mol Biol*, 1993, **23**: 489
[29] 朱道圩等. *河南农业大学学报*, 2004, **38**: 174

Expression of Thaumatin Gene in Horticultural Crops

Dao-Yu Zhu*, Yong-Hua Qin¹, Shang-Long Zhang¹

(Department of Horticulture, Faculty of Forestry and Horticulture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; ¹Department of Horticulture, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract Thaumatin is a protein which is isolated from the katemfe fruit of west Africa (*Thaumatococcus daniellii* Benth). Two main forms, thaumatin I and thaumatin II, are known. It is a new sweetener with many advantages such as high sweetness, low calories, no toxicity and nice sweet taste, and especially is suitable for diabetics. The gene for thaumatin has been transferred to horticultural crops in attempts to improve taste. Several research aspects were reviewed in this paper, including thaumatin cDNA cloning and sequencing, expression and inheritance of thaumatin gene in plants, analysis of fruit taste, evaluation of the food safety of genetically modified fruit and transgenic plant tolerance for pathogenic fungus. Some problems in transformation were discussed, and suggestion was given to the future research work of this field.

Key words sweet protein; thaumatin; genetic transformation

Received: December 16, 2004 Accepted: May 18, 2005

This work was supported by the Natural Science Foundation of Henan Province (No.0111011700)

*Corresponding author. Tel: 86-371-63555837, E-mail: zhudaoyu@yahoo.com