

重组敬钊毒素在毕赤酵母中的表达与纯化研究

蒋倩倩, 李慧玲, 刘莉莉, 高宁, 程玉鹏* (黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要 [目的]研究重组敬钊毒素在毕赤酵母中的表达与纯化。[方法]通过设计、构建 Jztx-III/pPIC9k 表达载体,经电转化、甲醇诱导后使敬钊毒素在毕赤酵母 GS115 中进行表达,并利用 C-端 6×His 标签进行分离纯化。[结果]Jztx-III 可以在毕赤酵母 GS115 中高效表达,经亲和层析纯化后其产量可达到 95 mg/L。[结论]该试验结果解决了敬钊毒素资源有限产量较低的问题。

关键词 蜘蛛毒素;毕赤酵母;基因工程

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)19-06166-01

The Expression and Purification of Jingzhao Toxin in *Pichia pastoris*

JIANG Qian-qian, CHENG Yu-peng et al (College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang 150040)

Abstract [Objective] To study expression and purification of Jingzhao toxin in *Pichia pastoris*. [Method] Jztx-III GS115/pPIC9k plasmid was constructed to express Jingzhao toxin-III in *Pichia pastoris*. A 6×His tag in C-terminus was employed to purify the recombinant Jztx-III. [Result] The results showed that Jztx-III can be expressed in *Pichia pastoris* GS115 effectively. The production of Jztx-III can reach to 95 mg/L after purified by affinity chromatography. [Conclusion] The experiment results solve the problem of lower yield of Jingzhao toxin limited resource.

Key words Spider toxin; *Pichia pastoris*; Genetic engineering

蜘蛛毒素成分复杂,由一系列蛋白质、多肽、神经毒素、核酸、氨基酸、无机盐组成,这些成分可以对脊椎动物和无脊椎动物产生不同的生物学效应^[1]。根据蜘蛛毒素的药理和生物化学特性,蜘蛛毒素可以分为离子通道毒素、非神经毒素、酶及低分子量化合物^[2]。

敬钊毒素-III (Jztx-III,分子量 3 919.3 Da)是从中国狼蛛敬钊缨毛蛛中分离的小分子多肽,由 36 个氨基酸组成且分子结构复杂,其内部含有 3 个交错的二硫键分别是:I-IV, II-V 和 III-VI (Cys4-Cys19, Cys11-Cys24, and Cys18-Cys31)^[3]。这种毒素专一作用于钾离子电压门控通道 Kv2.1 和钠离子电压门控通道 Nav1.5,而对其他亚型的电压通道无作用。正是由于其对电压离子通道的特异性及独特的分子机制,使得 Jztx-III 成为研究电压敏感型毒素和离子通道相互作用的理想工具。但是由于敬钊毒素来源有限且含量低,限制了其在研究和医疗上的应用,因此研究开发蜘蛛毒素合成方法降低生产成本是目前亟待解决的问题。基因工程是生产生物活性肽的理想途径,但目前对于重组 Jztx-III 多肽的表达的研究鲜有报道。笔者通过设计构建 pPIC9k/Jztx-III 表达载体,在毕赤酵母中表达重组敬钊毒素-III 并利用其 C-端 6×His 标签进行分离纯化,以期对蜘蛛毒素的药物开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 表达载体 pPIC9k、*E. coli* JM109、毕赤酵母 GS115 菌株,均由黑龙江中医药大学生物技术教研室保存。

1.2 Jztx-III 的基因设计与合成 根据敬钊毒素-III 全长基因序列及毕赤酵母偏爱密码子对其进行全基因合成,5'

端添加 EcoRI 位点,3' 端添加 NotI 位点,同时在 3' 端添加编码 6×His 的分离纯化标签,该基因合成由上海生工完成。

1.3 重组表达质粒的构建 用限制性核酸内切酶 EcoRI 和 NotI 双酶切 pPIC9k 载体,以 T4 连接酶将合成的 JZTX-III 基因与载体连接,16℃ 连接 12 h,连接产物转化到大肠杆菌感受态细胞 JM109 中。挑出单菌落,进行双酶切鉴定,并送往上海生工进行测序。

1.4 pPIC9k/Jztx-III 电转化毕赤酵母 用 SacI 酶切重组表达质粒 pPIC9k/JZTX-III 使之线性化,电击转化至毕赤酵母菌 GS115,转化菌液涂布 RDB 平板,30℃ 培养 72 h,挑取单克隆,在 MD 平板上筛选 His⁺ 表型,分别接种于 G418 的 YPD 培养基平板上,筛选多拷贝转化子,对阳性重组子进行 PCR 鉴定。

1.5 Jztx-III 的诱导表达 挑选阳性菌落,置于 BMGY 培养基中,每 24 h 向培养基中添加 100% 甲醇至终浓度为 0.5%~1.0%。用 15% Tricine-SDS-PAGE 检测 JZTX-III 表达情况。

1.6 Jztx-III 的分离纯化 菌体发酵离心所获得上清,经 Millipore 超滤管浓缩除盐,利用 High Affinity Ni-NTA Resin (南京金斯瑞)进行亲和层析。洗脱产物由 15% Tricine-SDS-PAGE 检测。

2 结果与分析

2.1 pPIC9k/Jztx-III 表达载体构建 根据敬钊毒素-III 全长基因序列并依据毕赤酵母偏爱密码子设计合成敬钊毒素-III 的全长 DNA 序列,与表达载体 pPIC9k 连接后,经 EcoRI 和 NotI 双酶切及测序结果表明片段大小及序列与 pPIC9k 及 Jztx-III 大小相符。

2.2 pPIC9k/Jztx-III 阳性转化子的鉴定 pPIC9k/Jztx-III 经 SacI 酶线性化后,电转化至毕赤酵母菌 GS115,并经 MD 平板、G418 平板筛选获得了多拷贝转化子。选取其中 8 株

基金项目 黑龙江中医药大学校基金(201004);黑龙江中医药大学优秀创新人才支持计划(2012RCQ12)。

作者简介 蒋倩倩(1981-),女,黑龙江哈尔滨人,讲师,硕士,从事生物制药研究。* 通讯作者,副教授,博士,从事生物制药研究。

收稿日期 2014-06-04

(下转第 6169 页)

织质硬且量少,出愈率低。配合使用其他细胞分裂素(6-BA, ZT)时也不利于矮蕉假茎愈伤组织的诱导,这可能与植物激素的种类、浓度以及它们之间的组合使用情况有关^[10]。使用 25 mg/L 细胞分裂素 ZT, 胚性细胞悬浮系建立起来的时间最短, 悬浮细胞的长势也较好。低浓度 ZT 继代的效果较差, 而高浓度 ZT 有可能抑制胚性细胞悬浮系的生长。故设定的培养基中, 诱导矮蕉假茎切片胚性愈伤组织的最适宜培养基为 T2 培养基(MS + 0.02 mg/L TDZ + 7 mg/L 2,4-D), 最适宜液体培养基为 ZT2 培养基(1/2MS 大量元素 + MS 微量元素 + 10 mg/L V_c + 1.0 mg/L 2,4-D + 25 mg/L ZT)。

胚性愈伤组织既是诱导体胚再生植株的重要材料, 又是原生质体培养、细胞融合及外源基因转化的理想材料^[11]。总体来说, 香蕉胚性愈伤组织诱导率较低(通常小于 1%), 且品种间差异大, 只能从约 1/5 ~ 1/2 质量好的胚性愈伤组织中获得 ESC^[8]。试验只是针对矮蕉进行了初步的研究, 而如何筛选出适用于不同香蕉品种的诱导培养体系仍需广大科研工作者的不懈努力。

参考文献

[1] 李宝荣, 张向平. 目前国内主栽香蕉品种的引种过程及存在的问题

(上接第 6166 页)

His⁺ 阳性重组子进行 PCR 鉴定(图 1)。经过 PCR 扩增后获得 2 个片段, 分别为 2.2 kb 的 AOX 基因和 642 bp (Jztx - III + 492kb 侧翼序列) 片段, 证明 Jztx - III 已经整合入 GS115 基因组。

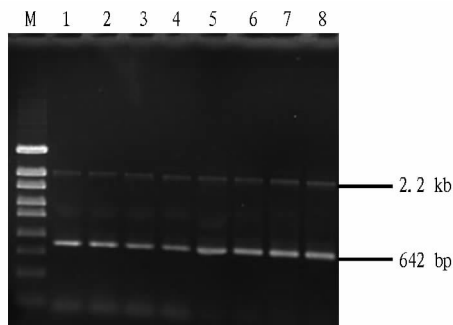


图 1 pPIC9k/Jztx - III 阳性转化子的 PCR 鉴定结果

2.3 重组 Jztx - III 的分离纯化 含有 pPIC9k/Jztx - III 的阳性菌落在 BMGY 培养基培养并甲醇诱导 72 h 后产量达到最高, 利用 High Affinity Ni - NTA Resin 进行亲和层析, 样品经洗脱液洗脱后, 15% Tricine - SDS - PAGE 检测(图 2), 结果显示, 经纯化后获得分子量为 5 kD 左右的多肽, 该分子量与敬钊毒素 - 3 理论值 3.9 kD 加 0.84 kD 的 6 × His 标签相符。经 BCA 法检测发现, Jztx - III 浓度可达到 95 mg/L。

3 结论与讨论

蜘蛛毒素为富含二硫键的多肽, 其分子量小、结构复杂、体外的折叠效率比较低, 因此很难通过化学合成的方法复现其功能区。采用基因工程方法, 在体内进行蜘蛛毒素的合成是一条理想的途径。试验选择巴斯德毕赤酵母作为 Jztx - III

[J]. 中国南方果树, 2002, 31(4): 30 - 31.

- [2] 刘进平, 莫饶. 热带植物组织栽培[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 68.
- [3] DHED' A D, DUMORTIER F, PANIS B, et al. Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. "Bluggoe" (Musasp. ABB group) [J]. Fruits, 1991, 46(2): 125 - 135.
- [4] ESCALANTJ V, TEISSONC, COTE F X. Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (Musasp.) [J]. In Vitro Cell Dev Biol Plant, 1994, 30: 181 - 186.
- [5] COTE F X, DOMERGUE R, MONMARSON S, et al. Embryogenic cell suspensions from the male flower of MusaAAA cv. Grand Nain [J]. Physiol Plant, 1996, 97: 285 - 290.
- [6] GRAPINA, ORTIZ J L, LESCOTT, et al. Recovery and regeneration of embryogenic culture from female flower of False Horn plantain (MusaAAB) [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2000, 61: 237 - 244.
- [7] 徐春香, PANIS B, STROSSE H, 等. 香蕉胚性愈伤组织的诱导及胚性细胞悬浮系的建立[J]. 华南农业大学学报, 2004, 25(1): 70 - 73.
- [8] SCHOOF H, PANIS B, STROSSE H, et al. Bottlenecks in the generation and maintenance of morphogenic banana cell suspensions and plant regeneration via somatic embryogenesis therefrom [J]. Info Musa, 1999, 8(2): 3 - 7.
- [9] 刘晓光. 枣愈伤组织诱导和原生质体分离研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2006.
- [10] 冯大领, 孟祥书, 王艳辉, 等. 植物生长调节剂在植物体细胞胚发生中的应用[J]. 核农学报, 2007, 21(3): 256 - 260.
- [11] 鲁旭东, 萧浪涛, 刘素纯, 等. 2,4-D 对石刁柏愈伤组织诱导的影响[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(21): 5546 - 5548.

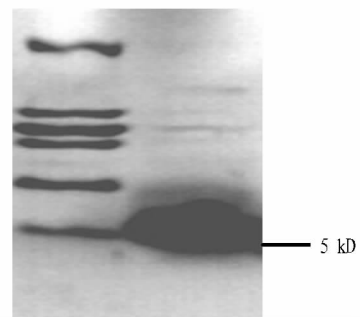


图 2 Tricine - SDS - PAGE 检测纯化的 Jztx - III

的表达体系, 其优势在于酵母表达系统是具有高效分泌的真核表达系统, 可对目的蛋白进行翻译后修饰, 帮助敬钊毒素形成正确结构。同时, 为了进一步提高 Jztx - III 的表达量, 试验根据毕赤酵母偏爱密码子对 Jztx - III 基因进行了优化设计, 并在其 C - 端添加了 6 × His 标签, 构建了 pPIC9k/Jztx - III 表达载体, 该标签的加入有利于表达后的分离纯化且不对多肽的活性有影响。经电转化、甲醇诱导、High Affinity Ni - NTA 纯化后, Jztx - III 可以成功在毕赤酵母 GS115 中表达, 产量达到 95 mg/L, 实现了 Jztx - III 在毕赤酵母中得高效表达。而对于重组 Jztx - III 的生物学活性, 有待于进一步研究。

参考文献

- [1] ORI M, IKEDA H. Spider venoms and spider toxins [J]. Journal of Toxicology - Toxin Reviews, 1998, 17(3): 405 - 426.
- [2] RASH L D, HODGSON W C. Pharmacology and biochemistry of spider venoms [J]. Toxicon, 2001, 40(3): 225 - 254.
- [3] XIAO Y C, TANG J Z, YANG Y J, et al. Jingzhaotoxin-in-III, a novel spider toxin inhibiting activation of voltage-gated sodium channel in rat cardiac myocytes [J]. J Biol Chem, 2004, 279(25): 26220 - 26226.