

虎纹镇痛活性肽在毕赤酵母中的分泌表达*

何宁佳 聂东宋 徐辉明 李 敏 梁宋平**

(湖南师范大学生命科学学院, 长沙 410081)

摘要 虎纹镇痛活性肽 HWAP-I 是从虎纹捕鸟蛛初毒中分离纯化, 具有镇痛活性的多肽类神经毒素. 为了在 *P. pastoris* 中高效分泌表达 HWAP-I, 依照 RT-PCR 的结果, 人工合成编码虎纹镇痛活性肽的基因片段, 与酵母表达载体 pPIC9K 重组, 构建表达质粒 pPIC9K-HWAP-I. 转化 GS115 宿主菌后, 筛选出整合型 His⁺ Mut^S 表达菌株. 经诱导培养后, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 证明 HWAP-I 在毕赤酵母中能有效分泌表达, 产物的分子质量为 4 ku 左右, 产量达 80 mg/L. 体外小鼠输精管阻断实验证实表达产物具有明显的生物活性.

关键词 虎纹镇痛活性肽, 毕赤酵母, 分泌表达

学科分类号 Q78

从分布在我国广西和云南所特有的虎纹捕鸟蛛 (*Selenocosmia huwena*) 毒液中分离到一种具有可逆性阻断神经突触传递功能的多肽类毒素^[1], 发现其具有明显的镇痛活性, 命名为虎纹镇痛活性肽 (Huwena analgesic peptide, HWAP-I). 它由 33 个氨基酸残基组成, 相对分子质量为 3750. HWAP-I 含有 3 对二硫键, 维持其特定的空间结构^[2]. 经研究发现, HWAP-I 的镇痛活性具有潜在的临床应用价值. 因此, 利用基因表达获得重组的 HWAP-I, 不仅将促进其研究的进一步深入, 而且为其早日进入临床奠定基础.

研究中使用了特别适合于表达二硫键多的蛋白质分泌型 *Pichia pastoris* 表达系统, 首次成功地在甲醇酵母中表达了有活性的 HWAP-I, 对其应用开发具有重要意义.

1 材料与方法

1.1 酶与主要试剂

限制性内切酶、连接酶、Taq DNA 聚合酶、T4 多核苷酸激酶和 CIP 均购自 Promega 公司. 酵母用培养基见 Invitrogen 公司操作手册, 蛋白胨、酵母提取物购自上海生工公司, 蛋白质低分子质量标准购自 Invitrogen 公司. 阳离子交换柱 CM, 反相 HPLC YWG C₁₈ 为本室自装, 其余试剂均为国产分析纯或色谱纯.

1.2 质粒与菌株

质粒载体 pPIC9K、克隆宿主菌 TOP10F' 和酵母菌 GS115 购于 Invitrogen 公司.

1.3 重组克隆的构建和筛选鉴定

按照已得到的 cDNA 序列合成了 6 条编码 HWAP-I 的寡聚核苷酸单链. 寡聚核苷酸链的 5' 末端磷酸化, 互补退火, 连接和克隆入 pPIC9K 的 *EcoRI* 位点以及转化感受态的 Top10F' 参照《分子克隆》. 以合成片段 (f 链: 5'-AATTCTCACAGCTTCCATTTGC-ACCACTTGTG-3') 和位于克隆位点上游的一段载体序列 (α-factor: 5'-TACTATTGCCAGC-ATTGCTGC-3') 为引物, 适当组合, 采取 PCR 方法, 筛选鉴定出所需重组克隆. PCR 反应条件 94℃, 1 min, 55℃, 1 min, 72℃, 1 min, 35 个循环. 进一步的 DNA 测序分析由上海植物生理研究所完成.

1.4 酵母的转化和筛选

制备酵母 GS115 的感受态细胞, 并将 Bgl II 线性化的重组质粒 DNA pPIC9K-HWAP-I 转化此感受态细胞, 转化完成后涂布于 RDB 再生板上, 30℃ 培养直至转化子出现. 用牙签挑取转化子同时点种于 MD, MM 板上, 选取在 MD 上生长正常而在 MM 平板上生长较缓慢 (表型为 His⁺ Mut^S) 的转化子为阳性克隆子进行表达菌株的培养和诱导表达.

1.5 酵母转化子的 PCR 鉴定

挑转化子的单菌落接种于 10 ml MGY 培养液中, 振荡培养至 A₆₀₀ 值为 5, 按照 Invitrogen 公司操

* 国家自然科学基金资助项目 (39670392).

** 通讯联系人.

Tel: 0731-5577663, E-mail: Liang sp@public.cs.hn.cn

收稿日期: 2001-01-06, 接受日期: 2001-02-23

作手册推荐的方法提取转化子的基因组 DNA. 用试剂盒中的 AOX₁ 5' 引物 (5' - GACTGGTTCC - AATTGACAAGC - 3') 和 AOX₁ 3' 引物 (5' - GCAAATGGCATTCTGACATCC - 3') 进行 PCR 扩增. 反应条件 94 °C, 1 min, 55 °C, 1 min, 72 °C, 1 min; 35 个循环.

1.6 表达菌株的培养及诱导表达

接种菌株于 2 ml YPD 中 (10 g/L 酵母提取物, 20 g/L 蛋白胨, 20 g/L 葡萄糖), 30 °C、250 r/min 摇床培养过夜, 再以 1% 的量接种于 100 ml BMGY 培养液中 (10 g/L 酵母提取物, 20 g/L 蛋白胨, 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液 pH 6.0, 13.4 g/L 酵母含氮碱基 (YNB), 4×10^{-4} g/L 生物素, 10 g/L 甘油), 置于 30 °C, 250 r/min 的摇床上培养至 A_{600} 达 4~8. 5 000 r/min 离心收集菌体后, 用 20 ml BMMY 培养液 (10 g/L 酵母提取物, 20 g/L 蛋白胨, 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液 pH 6.0, 13.4 g/L YNB, 4×10^{-4} g/L 生物素, 5 ml/L 甲醇) 轻悬细胞后于 28 °C, 250 r/min 诱导培养 7 d, 期间每隔 24 h 补加 100% 甲醇使其终浓度达 0.5%.

1.7 表达产物的 SDS PAGE 分析

表达菌株经诱导培养后, 取适当发酵上清液冻干后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 分析. 对于小分子量多肽, 采用 Tricine-SDS-PAGE 蛋白质电泳系统^[3], 浓缩胶 3%, 分离胶 16.5%, 考马斯亮蓝 R250 染色观察.

1.8 表达产物的纯化

表达菌株培养至最佳表达时间后, 离心收集培养上清, 用 90% 饱和度硫酸铵沉淀蛋白质过夜. 经 YW-3 (MWCO 3 000) 超滤膜超滤脱盐后过 Protein PakTM 柱, 在 WatersTM 650E Advanced Protein Purification System 上进行阳离子交换层析. 0~0.8 mol/L NaCl 线性梯度洗脱, 收集洗脱峰, 经质谱鉴定后上样于 YWG C₁₈ 柱反相 HPLC 脱盐, 以 10%~40% 乙腈-0.1% TFA 梯度洗脱, 最后收集所需蛋白质, 真空冷冻干燥.

1.9 质谱鉴定

经 CM 阳离子交换和反相 HPLC 收集的峰, 均取 1.5 μ l, 加 9 μ l α -氰基-4-羟基肉桂酸 (CCA) 振荡混匀取 1.5 μ l 上样, 在 MALDI-TOF 上鉴定相对分子质量.

1.10 蛋白质含量的测定

采用 Pierce 公司的 BCATM-200 Protein Assay 试剂盒测定蛋白质含量.

1.11 表达产物的活性检测

参照 Waterman^[4] 的方法进行. 小白鼠脱颈椎致死, 剥取输精管标本, 将剥离的离体输精管标本浸泡在 3 ml 通有 95% O₂ 和 5% CO₂ 混合气体的 Krebs 溶液 (NaCl 6.95 g/L, KCl 0.35 g/L, KH₂PO₄ 0.16 g/L, NaHCO₃ 2.10 g/L, MgSO₄ 0.37 g/L, D-葡萄糖 2.18 g/L, CaCl₂ 0.37 g/L) 中; 每间隔 30 s 给予刺激一次, 用二道生理记录仪记录. 同时将纯化的样品 HWAP-I 与天然的 HWAP-I 都用 Krebs 液配成 1.0×10^{-5} g/ml. 待浸泡在 Krebs 液中的标本收缩平稳后, 改用上述浓度的待测样品溶液浸泡, 观察结果, 每个样品至少做 3 例. 测定样品阻断小鼠输精管平滑肌的时间. 以阻断时间为横坐标, 活性收缩强度为纵坐标, 作图.

2 结 果

2.1 表达载体 pPIC9K-HWAP-I 的构建和筛选

虎纹镇痛活性肽由 33 个氨基酸组成, 相对分子质量为 3 750. 为了在甲醇酵母系统中正确地表达 HWAP-I 蛋白, 采用人工方法分段合成了该基因, 命名为 H 片段, 并在 H 片段的 5' 端加上 EcoRI 酶切位点, 3' 端加上 TGA 终止序列和 EcoRI 酶切位点. 将 H 片段与酵母载体 pPIC9K 重组获得重组质粒 pPIC9K-HWAP-I, 由于外源片段插入载体时存在正反插入两种可能性, 而反向插入不能正确表达, 故须对重组子作进一步的 PCR 鉴定. 用载体 pPIC9K 上 5' 端 α -factor 引物序列为上游引物和 f 单链为下游引物时, 可扩增出 179 bp 片段者为正向连接, 而反向连接无扩增产物 (图 1). 对筛选到的正向连接的阳性克隆进行

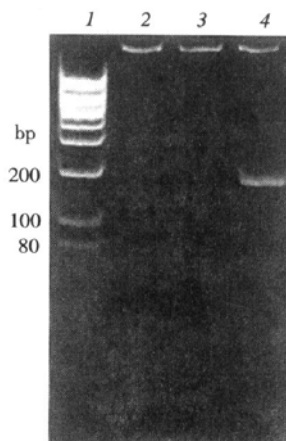


Fig. 1 PCR assay of insert direction of foreign fragment

1: DNA marker (ladder DNA); 2, 3: reverse ligation;

4: positive ligation.

测序 (图略), 结果进一步证实了插入片段及其方向的正确性, 表明了外源蛋白质阅读框的正确性.

2.2 甲醇营养型酵母的转化和筛选

宿主细胞 GS115 为 His 缺陷型 (His⁻), 而重组载体上带有 His⁴ 基因而无酵母复制起始位点. 以 Bgl II 线性化 pPIC9K-HWAP-I 后转化感受态 GS115 能通过 AOX₁ 基因位点的替换使外源基因同源重组到酵母染色体上. 这样在不加 His 的再生培养基 RDB 上只有重组酵母才能生长, 而重组酵母又使宿主菌的醇氧化酶基因受到破坏, 使它在甲醇作为碳源的 MM 培养基上生长缓慢, 在 MD 培养基上正常生长. 为进一步确证酵母基因组中有 HWAP-I 表达单元的整合, 挑取表型为 His⁺、Mut^S 的转化子, 提取其基因组 DNA, 用 5' AOX₁ 引物和 3' AOX₁ 引物进行 PCR 鉴定, 扩增得到

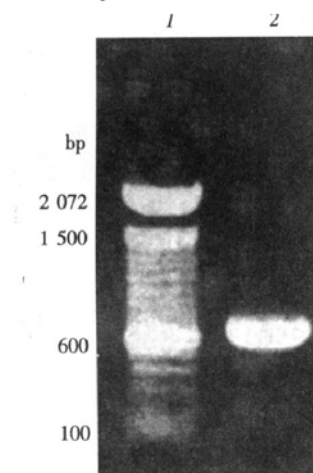


Fig. 2 Identification of recombinants by PCR

1: λDNA/Hind III; 2: His⁺ Mut^S recombinants.

600 bp (492 bp AOX₁ + 108 bp HWAP-I inserted sequence) 特异带 (图 2), 证明转化子基因组中确有 HWAP-I 表达单元的整合.

2.3 HWAP-I 的分泌表达

取适量表达株 GH1 培养液上清进行 Tricine SDS-PAGE 分析, 结果表明 (图 3), 诱导表达的外源蛋白质分子质量约为 4 000, 而对照空载体菌 G9K 在该位置并无条带. 经扫描成像系统与已知量 HWAP-I 含量比较分析, 分子质量为 4 000 的蛋白质占总分泌蛋白质的 23.6%, 由此推算每升发酵液可达 80 mg/L 虎纹镇痛活性肽, 经培养条件的实验结果表明, 诱导 HWAP-I 在甲醇酵母中表达的甲醇浓度为 0.5%, 诱导时间确定为 6 d.

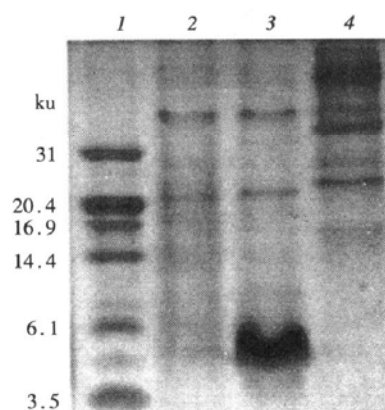


Fig. 3 Tricine SDS PAGE of HWAP-I secreted by GS115 (Mut^S His⁺)

1: low molecular marker; 2: G9K; 3: GH1.

2.4 表达产物的纯化

表达产物纯化后为单一的峰 (图 4). 发酵上清液

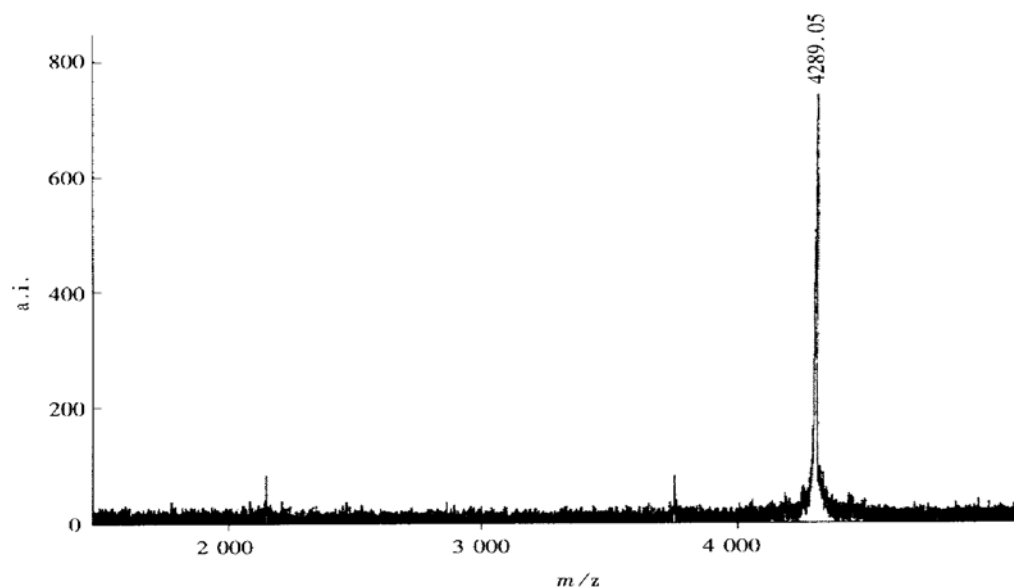


Fig. 4 MALDI-TOF mass spectra of recombinant HWAP-I

经 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀浓缩, 超滤及阳离子交换后, 经质谱检测分子质量为 4 289 的单一峰. 因阳离子交换所得样品含大量盐, 不能用于活性测定, 要进一步反相 HPLC 脱盐纯化. 纯化后样品再经质谱测定, 为单一的峰 (图 4), 最后 SDS-PAGE 鉴定亦表明反相 HPLC 脱盐后的样品在电泳图上为单一条带 (图 5).

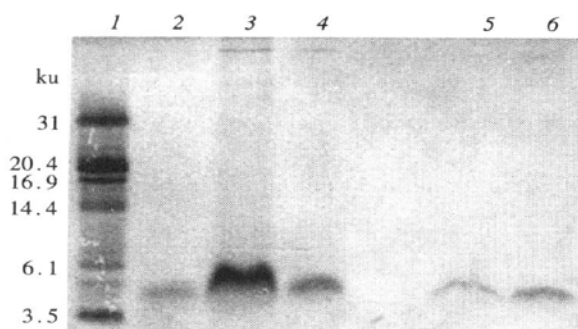


Fig. 5 Tricine SDS PAGE of samples at various steps along the HWAP-I purification

1: low molecular mass marker; 2: culture supernatant; 3: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation; 4: ultrafiltration supernatant; 5: purified HWAP-I; 6: native HWAP-I.

2.5 表达产物的生物活性检测

将表达的 HWAP-I 用 Krebs 液配成浓度为 1×10^{-5} g/ml, 取 3 ml 浸泡小鼠输精管离体标本, 给予电刺激, 记录其阻断时间, 与天然的 HWAP-I 进行比较, 结果显示: 天然 HWAP-I 平均阻断时间为 (10 ± 2) min, 而表达产物的平均阻断时间为 (15 ± 2) min, 表明表达的 HWAP-I 活性只有天然 HWAP-I 的 60% 左右 (图 6).

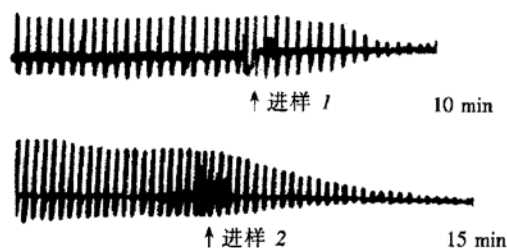


Fig. 6 Effect of recombinant HWAP-I on neuromuscular transmission in isolated mouse spermatid

1: native HWAP-I; 2: recombinant HWAP-I.

3 讨论

虎纹镇痛活性肽 HWAP-I 是一种作用于突触

前膜的神经毒素^[5], 而且是一种 N 型 Ca^{2+} 离子通道的阻断剂. 最近研究发现其有明显的镇痛效果, 与吗啡比较, 成瘾性低并无其他毒副作用, 具有良好的开发前景. 本研究室李敏等^[6] 在大肠杆菌中对 HWAP-I 进行了原核表达, 但因 HWAP-I 有三对二硫键, 原核表达产物复性较困难, 并且大肠杆菌细胞壁的脂多糖为强有力的内毒素原, 不利于大规模的开发利用. 毕赤酵母表达系统 *P. pastoris* 是近年来发展起来的极具潜力的表达体系^[7], 既具有真核生物蛋白质翻译后加工能力, 又拥有易于培养, 繁殖快操作简便的特点. 许多外源基因在该系统中得到了成功的分泌表达^[8], 其分泌表达的特点又有利于表达那些含二硫键多翻译后需要正确架接、折叠成有生物活性形式的蛋白质. 针对 HWAP-I 本身的特点, 在毕赤酵母 *P. pastoris* 中首次分泌表达了 HWAP-I, 实验室摇瓶发酵表达量达 80 mg/L, 表达的重组蛋白质经纯化后其活性为天然蛋白质的 60% 左右. 为下一步基因工程大规模生产摸索了条件并提供了依据.

参 考 文 献

- 1 Liang S P, Zhang D Y, Pan X, *et al.* Properties and amino acid sequence of huwentoxin I, neurotoxin purified from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena*. *Toxicon*, 1993, **31** (8): 969~978
- 2 梁宋平, 潘 欣. 蜘蛛肽类神经毒素研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 1994, **21** (5): 390~395
Liang S P, Pan X. *Prog Biochem Biophys*, 1994, **21** (5): 390~395
- 3 夏其昌. 蛋白质化学研究技术与进展, 北京: 科学出版社, 1997. 105~107
Xia Q C. *Progress and Technology in Protein Research*, Beijing: Science Press, 1997. 105~107
- 4 Waterman S A. Role of N-P and Q-type voltage-gated calcium channels in transmitter release from sympathetic neurones in the mouse isolate was deference. *British J Pharmacology*, 1997, **120**: 393~398
- 5 Liang S P, Chen X D, Shu Q, *et al.* The Presynaptic activity of huwentoxin I, a neurotoxin from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena*. *Toxicon*, 2000, **38**: 1237~1246
- 6 Li M, Li L Y, Wu X S, *et al.* Cloning and functional expression of a synthetic gene encoding huwentoxin I, a neurotoxin from the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena*. *Toxicon*, 2000, **38**: 153~162
- 7 涂宣林, 宋后燕. *P. pastoris* 高效表达外源蛋白的研究进展. *生物工程进展*, 1998, **18** (4): 19~21
Tu X L, Song H Y. *Progress in Biotechnology*, 1998, **18** (4): 19~21
- 8 Romanose M A, Scorer C A, Clare J J. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, 1992, **8** (6): 423~488

Secretion Expression of Huwena Analgesic Peptide Gene in the Yeast *Pichia pastoris**

HE Ning-Jia, NIE Dong-Song, XU Hui-Ming, LI Min, Liang Song-Ping**
(College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract HWAP- I is a peptide neurotoxin purified from the crude venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia humena*, which has analgesic activity. According to the RT-PCR result, an artificial gene encoding HWAP- I was chemically synthesized. The gene was then inserted into pPIC9K, a secretory expression vector for *Pichia pastoris*. The constructed pPIC9K-HWAP- I was transformed into his⁴ mutant yeast GS115 and a Mut^s His⁺ cell line was screened. The recombinant HWAP- I was secreted into the culture supernatant induced by 0.5% methanol. Tricine SDS-PAGE analysis indicated efficient expression and secretion of HWAP- I. The molecular mass of product was about 4 ku. Yield of product was estimated to be 80 mg/L. Purified protein was assayed for biological activity and the results demonstrated that HWAP- I had 60% analgesic activity compared to native HWAP- I.

Key words HWAP- I (Huwena analgesic peptide I), *Pichia pastoris*, secretory expression

* This work was supported by a grant from the National Natural Sciences Foundation of China (39670392).

** Corresponding author. Tel: 86-731-5577663, E-mail: Liang sp@public.cs.hn.cn

Received: January 6, 2001 Accepted: February 23, 2001

作者启事

拙文“鼻咽癌细胞中EB病毒编码的潜伏膜蛋白1活化CyclinD1的表达”已发表在《生物化学与生物物理进展》2001, 28 (5): 704~710. 该文受国家自然科学基金杰出青年基金(39525022), 国家重点基础研究发展规划(973)“鼻咽癌发生发展的基础研究”(G1998051201)及国家自然科学基金(30100005)资助.

特此声明.

作者: 赵晓荣等