

# 东亚钳蝎神经毒素基因 BmK IT<sub>3</sub> 的克隆及其在大肠杆菌中的表达

于继彬<sup>1</sup> 季平<sup>1</sup> 查新民<sup>1</sup> 沈卫德<sup>1\*</sup> 吴祥甫<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(苏州大学生命科学院蚕桑系, 苏州 215151)

<sup>2</sup>(中国科学院上海生命科学院生物化学与细胞研究所, 上海 200031)

**关键词** 东亚钳蝎神经毒素, 融合表达, 大肠杆菌

**中图分类号** Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2002)01-0106-03

东亚钳蝎神经毒素基因 BmK IT<sub>3</sub> 编码是由 65 个氨基酸残基组成的多肽物质。该类毒素为专一性作用于昆虫的抑制型神经毒素, 它已被广泛用于研究离子通道作用机理<sup>[1]</sup>; 同时, 它是研究蛋白质结构和功能的极好模型, 是研究神经药理学的理想工具, 将具有药理活性和昆虫毒性的基因导入细胞或动植物体内具有十分重要的应用价值。它对昆虫作用的专一性很高, 对哺乳动物无害或毒性很小, 可作为一种安全、有效的生物杀虫剂<sup>[2,3]</sup>。我们的研究是对该基因密码子进行优化, 采用化学合成的方法合成了适于在昆虫中表达的 BmK IT<sub>3</sub> 的两条长的引物, 通过搭桥法体外酶促合成而获得新基因 BmK IT<sub>3</sub><sup>R</sup>。由于检测方法受到一定限制, 我们首先将该人工合成的基因与 HIS<sub>6</sub> 融合并在大肠杆菌中进行了表达, 为进一步在昆虫体内表达时表达产物的检测方法的建立打下基础, 并对蝎毒素的功能学研究进行有益的探索。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 菌株和质粒:** 大肠杆菌 TG1 和质粒 pBluescript II SK 为本实验室保存; 表达菌株 *E. coli* BL21 (DE<sub>3</sub>) 和质粒 pET-28a 由上海生物化学与细胞学研究所吴祥甫教授保存。

**1.1.2 基因和引物:** 对照东亚钳蝎 (*Buthus martensii* Karsch) 神经毒素抑制型基因 BmK IT<sub>3</sub> 根据 BmNPV 密码子的偏爱性进行密码子优化, 由本实验室人工合成新基因 BmK IT<sub>3</sub><sup>R</sup>。

引物 1 和引物 2 由上海生工生物工程技术有限公司合成:

引物 1: TCTGCAGATCT ATG GAC GGA TAC ATA CGC GGA TCT AAC GGA TGT AAA GTT AGC TGC TTA TGG GGC AAC GAA GGC TGC AAC AAA GAA TGT AGA GCG TAT GGT GCA TCT TAC GG (112nt)

引物 2: CGAATTCA TCC ACA TGT GTT AGA CTC AGA TTT

CCA TGT CTT GTC GTC AGG CAA TCC TTC ACA CCA ACA CGC AAG TCC CCA TGT CCA GCA GAT TCC GTA AGA TGC ACC ATA TGC (113nt)

**1.1.3 酶及化学试剂:** 限制酶, DNA 聚合酶 I 大片段 (Klenow 酶), T4 DNA 连接酶均购自 GIBCO BRL 公司; 丙烯酰胺、亚甲叉双丙烯酰胺、Tris、Tricine、SDS 等化学试剂均购自上海生工生物工程技术有限公司。一抗为小鼠抗人 HIS<sub>6</sub> 单克隆抗体, 二抗为碱性磷酸酶标记的羊抗小鼠 IgG, 均为 GIBCO BRL 公司产品。

### 1.2 方 法

**1.2.1 基因的合成:** 体外酶促合成体系: 总体积 100μL, 其中 ddH<sub>2</sub>O 71.5μL, 10 × Buffer 10μL (with MgCl<sub>2</sub>), 20μmol dNTP, primer 1, 2 各 0.1μmol, Taq 酶 2.5u。反应条件: 94℃ 2min 变性后, 94℃ 45s, 56℃ 45s, 72℃ 45s, 2 个循环, 待引物充分互补后, 72℃ 10min 延伸而合成基因。

**1.2.2 基因的克隆及序列分析:** LMP 琼脂糖回收片段、基因克隆基本操作技术、转化、蓝白斑筛选及酶切鉴定等技术均按分子克隆实验手册所述方法进行。基因序列分析由上海基康生物技术有限公司协助完成。

**1.2.3 基因在大肠杆菌中的表达:** 挑取含有目的基因的重组质粒的大肠杆菌 BL21 (DE<sub>3</sub>) 单菌落于 3mL 含卡那霉素 (50μg/mL) 的 LB 培养基中 37℃ 培养过夜。次日按 2% 比例接种于含卡那霉素 (50μg/mL) 的新鲜 LB 培养基中 37℃ 培养 2h, 加入 IPTG 至终浓度 0.2mmol/L, 诱导表达 4~5h。取 1mL 菌液于 1.5mL 离心管中 5000r/min 离心 1min。收集菌体, 加入 200μL 样品处理液, 煮沸 3~5min, 10000r/min 离心 30s。置 4℃ 备用。

**1.2.4 SDS-PAGE:** 采用 Tris-Tricine 系统<sup>[4]</sup>。浓缩胶浓度为 4%, 分离胶浓度为 10%; 以 15~20mA 恒流进行电泳, 待溴酚蓝进入分离胶后将电流调至 40~50mA, 并保持恒定, 电泳 1h 左右, 等溴酚蓝离胶下沿 0.5~1.0cm 处停止电泳。用考

收稿日期: 2001-06-09; 修回日期: 2001-09-06。

基金项目: 江苏省自然科学基金项目资助 (No. 99KJB180001)。

\* 通讯作者。Tel: 86-512-5112235; Fax: 86-512-5112235; E-mail: shenwd@public1.sz.js.cn

马斯亮蓝 R-250 染色液染色 4 ~ 5h,用脱色液置脱色摇床上脱色数次至蛋白条带清晰为止。

1.2.5 Western blot 分析:参照文献[5]进行。

转膜:转移缓冲液为 48mmol/L Tris, 39mmol/L 甘氨酸, 0.037% SDS, 20% (V/V) 甲醇, pH8.3;将上述 SDS-PAGE 的凝胶和硝酸纤维素膜(NC 膜)正确放置于电转移装置中,在 250mA 恒流条件下转移 35min 后将 SDS-PAGE 的凝胶上蛋白质条带转移到 NC 膜上。

封闭:将转移完毕的 NC 膜在含有 10% 脱脂奶粉的 PBS 缓冲液中 37℃ 封闭 1 ~ 2h,再用 PBS 洗涤 3 次。

第一抗体反应:经封闭洗涤后的 NC 膜放在经 PBS 稀释小鼠来源的 HIS<sub>6</sub> 单克隆抗体(1:1000)溶液中,4℃ 温育过夜,之后用 PBS 缓冲液洗 3 次,每次 10min。

第二抗体反应:用 PBS 稀释碱性磷酸酶标记的羊抗小鼠 IgG(1:500)二抗。之后把 NC 膜放其中 37℃ 温育 1 ~ 2h。之后用 PBS 漂洗 3 次。

显色:将上述处理后的 NC 膜置于含有氮蓝四唑(BNT)和 5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸(CIBP)的显色 Buffer (100mmol/L NaCl, 5mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 100mmol/L Tris·HCl, pH9.5)中显色至蛋白质条带清晰。

2 结果

2.1 基因的人工合成

BmK IT<sub>3</sub> 基因可编码 65 个氨基酸组成的多肽<sup>[3]</sup>,它与其它类型的昆虫毒素有极高的同源性,一般认为最后 3 个碱性氨基酸在蛋白质成熟后的加工过程中被切除。我们在基因合成时参考 Bj IT<sub>2</sub>、Lqg IT<sub>2</sub>、Lqh IT<sub>2</sub> 的基因特点也略去了可编码最后 3 个氨基酸的核苷酸序列。考虑到经济有效的原则,我们设计了两条长度分别为 112 和 113 个核苷酸的多聚核苷酸链引物,并用搭桥法体外合成基因。在合成引物时考虑到密码子的偏爱性,我们对原基因进行了密码子优化,在氨基酸序列不变的情况下,对该基因的 21 个核苷酸进行改变,使 G + C 含量由原来的 44% 提高到 52%。将合成的 IT<sub>3</sub><sup>R</sup> 基因克隆到 pSK 中,并进行序列分析,测得序列及原 BmK IT<sub>3</sub> 基因序列,结果见图 1。

IT<sub>3</sub><sup>R</sup>: ATG GAC GGC TAT ATT CGC GGC AGC AAC GGC TGC AAA GTA TCC  
IT<sub>3</sub>: ATG GAḂ GGA TAT ATḂ ḂGA GGA AGḂ AAC GGA TGC AAG GTḂ TCA  
IT<sub>3</sub><sup>R</sup>: TGC TTA TGG GGC AAT GAA GGC TGC AAT AAA GAA TGC AGA GCC  
IT<sub>3</sub>: TGC TTA TGG GGA AAT GAA GGḂ TGC AAT AAA GAA TGC AGA CGC  
IT<sub>3</sub><sup>R</sup>: TAC GGC GCC TCT TAT GGA TAT TGC TGG ACC TGG GGA CTT GCC  
IT<sub>3</sub>: TAC GGḂ GCC TCT TAT GGḂ TAT TGC TGG ACC TGG GGA CTT GCA  
IT<sub>3</sub><sup>R</sup>: TGC TGG TGC GAA GGC CTT CCT GAC GAC AAG ACA TGG AAA TCT  
IT<sub>3</sub>: TGC TGG TGḂ GAA GGC CTT CCT GAḂ GAḂ AAG ACA TGG AAA TCT  
IT<sub>3</sub><sup>R</sup>: GAA AGC AAT ACA TGC GGT  
IT<sub>3</sub>: GAA AGḂ AAT ACA TGC GGT ḂGG ḂAG ḂAG

图 1 人工合成基因 BmK IT<sub>3</sub><sup>R</sup> 与原东亚钳蝎毒素基因 BmK IT<sub>3</sub> 序列比较

Fig. 1 The sequence of the artificially synthesized gene BmK IT<sub>3</sub><sup>R</sup> compared with that of BmK IT<sub>3</sub>

2.2 大肠杆菌表达载体的构建

酶促反应法体外合成的 BmK IT<sub>3</sub><sup>R</sup> 基因经低熔点琼脂糖

回收片段,分别用 PstI 和 EcoRI 双酶切后与相同酶切的质粒 pSK 连接,然后转化大肠杆菌 TG1,通过蓝白斑筛选阳性克隆,结果筛选不到阳性克隆。随后我们将经酶切后的 BmK IT<sub>3</sub><sup>R</sup> 基因片段用 Klenow 酶补平,同时用 EcoRV 酶切消化载体 pSK;平端连接后转化 TG1,结果筛选到了阳性克隆。

选 3 个克隆测序分析,有 2 个克隆的基因出现了不同程度的碱基丢失现象,另一个克隆的基因在终止点处出现一碱基丢失,但不影响毒素的氨基酸序列,随后用 BglII 和 EcoRI 双酶切将 BmK IT<sub>3</sub><sup>R</sup> 基因从重载体 pSK(IT<sub>3</sub><sup>R</sup>)上切下,并克隆到经 BamHI 和 EcoRI 双酶消化过的表达载体 pET-28a 上,重组表达载体的构建过程见图 2。

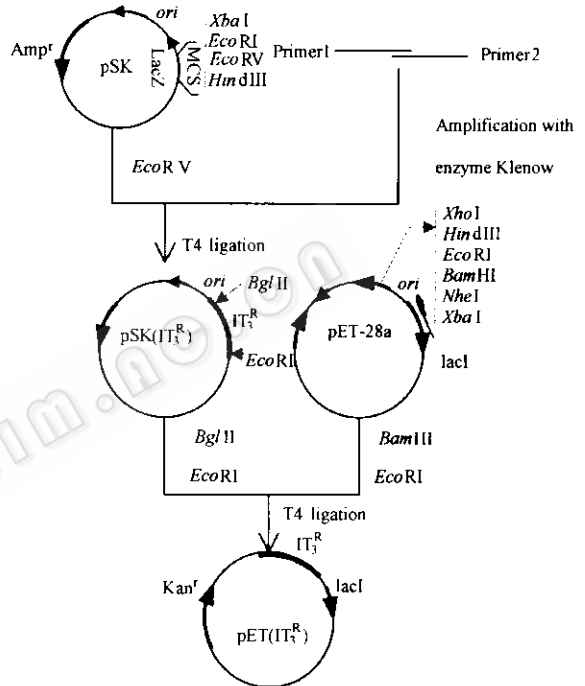


图 2 重组质粒 pET(IT<sub>3</sub><sup>R</sup>) 的构建方案

Fig. 2 Construction of recombinant plasmid pET(IT<sub>3</sub><sup>R</sup>)

2.3 基因的表达

将重组的表达载体 pET(IT<sub>3</sub><sup>R</sup>) 转化表达菌株 E. coli BL21 (DE<sub>3</sub>),当菌体达到适当密度后用 IPTG 进行诱导,在 T7 启动子启动下表达。将诱导表达后的菌株经 SDS-PAGE 分析,在 17kd 处有一明显的表达条带,这与推定的融合蛋白质的分子量大小相符合。表达量约占细菌总蛋白质量的 20%,并以可溶形式存在(见图 3)。

2.4 Western blot 分析

表达产物经 SDS-PAGE 后,将电泳后的蛋白质带采用电转移法转移到硝酸纤维素膜(NC 膜)上,用 10% 脱脂奶粉封闭后分别与抗 HIS<sub>6</sub> 的一抗和酶标二抗结合,显色后发现经 IPTG 诱导后的表达菌株中在 17kd 处能产生特异的表达条带,而对照菌株中未有特异表达条带出现(见图 3)。进一步证实了该新型蝎毒素基因以融合蛋白的形式得到了高效表达。

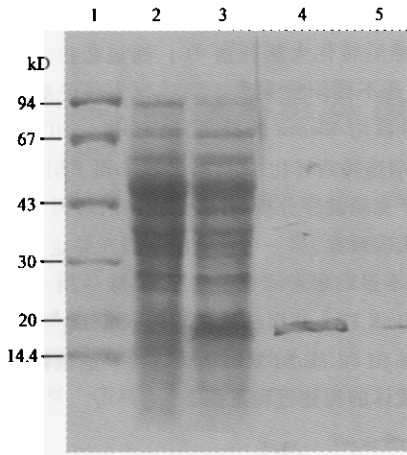


图3 新型东亚钳蝎毒素基因 BmK IT<sub>3</sub><sup>R</sup> 在大肠杆菌 *E. coli* BL21 中的表达产物 SDS-PAGE 检测及 western blot 分析

Fig. 3 SDS-PAGE and western blot analysis of the expression product in *E. coli* BL21 [DE<sub>3</sub>, pET(IT<sub>3</sub><sup>R</sup>)]

1. Standard protein marker; 2. SDS-PAGE analysis of the expression product of pET(IT<sub>3</sub><sup>R</sup>) in BL21 without IPTG;
3. Expression of pET(IT<sub>3</sub><sup>R</sup>) in BL21 with IPTG;
4. Western blotting of pET(IT<sub>3</sub><sup>R</sup>) expressing product with IPTG;
5. Control of expression of pET(IT<sub>3</sub><sup>R</sup>) without IPTG

### 3 讨 论

获得蝎毒素基因的方法有多种,目前学者主要以克隆 cDNA 的策略而获得<sup>[2]</sup>。本文中采用了搭桥法进行体外酶促反应而获得,相对来讲,它免去了构建 cDNA 文库的繁杂手续,且利于密码子优化,操作比较迅速;而蝎毒素基因只有 180 个碱基对左右,合成其两条互补的长引物成本也相对较

低。但在合成引物的同时也发现长引物在操作时容易出现碱基的丢失,分析其原因,一方面可能是合成时长引物容易出现错误,另一方面在体外合成时 Taq 酶或 Klenow 酶的保真性较差。

BmK IT<sub>3</sub> 是东亚钳蝎抑制型昆虫毒素基因的一种,该基因表达的蝎毒素具有对昆虫专一选择性的神经麻痹致死作用,因此在农业上有非常诱人的应用前景。我们对该基因的密码子进行了优化,使之符合昆虫表达系统的要求。在本研究中,我们将该基因在大肠杆菌中进行了融合表达,为蝎毒素的定量测定方法建立创造了条件。有利于进一步研究昆虫表达系统中基因表达产物的特性及基因工程杆状病毒杀虫剂的研制。

### REFERENCES(参考文献)

- [1] Gordon D. A new approach to insect-pest control—combination of neurotoxins interacting with voltage sensitive sodium channels to increase selectivity and specificity. *Invert Neurosci*, 1997, 3(2): 103 ~ 116
- [2] ZHU S Y(朱顺义) *et al.* Advances in molecular biology of scorpion toxin genes. *Prog Biochem Biophys* (生物化学与生物物理进展), 1999, 26(4): 319 ~ 332
- [3] ZHU X S(朱新生) *et al.* Cloning and sequencing of two insect-inhibiting toxin cDNA in *Buthus martensii* Karsch. *Chinese Science Bulletin* (科学通报), 1996, 41(20): 1882 ~ 1886
- [4] Schagger H *et al.* Tricine-Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for separation of proteins in the range from 1 to 100kD. *Anal Biochem*, 1987, 166: 368 ~ 373
- [5] Sambrook J *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup>, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

## Cloning and Expression of *Buthus martensii* Karsch Scorpion Toxin Gene (BmK IT<sub>3</sub>) in *Escherichia coli*

YU Ji-Bin<sup>1</sup> JI Ping<sup>1</sup> ZHA Xin-Min<sup>1</sup> SHEN Wei-De<sup>1\*</sup> WU Xiang-Fu<sup>2</sup>

<sup>1</sup> (College of Life Sciences, Suzhou University, Suzhou 210006, China)

<sup>2</sup> (Shanghai Biochemistry and Cell Institute, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

**Abstract** According to the reported sequence of *Buthus martensii* Karsch scorpion toxin gene (BmK IT<sub>3</sub>), we synthesized two primers, which were complementary in a region. By the means of PCR, we got the gene. The gene was fused in expression vector pET-28a, which gave rise to a recombinant plasmid pET(IT<sub>3</sub><sup>R</sup>). Then it was transformed into *E. coli* BL21 (DE<sub>3</sub>). With IPTG induction, the gene was efficiently expressed. And the fusion product was soluble.

**Key words** *Buthus martensii* Karsch, *E. coli* BL21 (DE<sub>3</sub>), fused expression

Received: 06-09-2001

This work was supported by a grant from the Natural Science Foundation of Jiangsu Province Education Committee (No. 99KJB180001).

\* Corresponding author. Tel: 86-512-5112235; Fax: 86-512-5112235; E-mail: shenwd@public1.sz.js.cn