

毕赤酵母表达 HWTX- I 的不均一性分析

The Analysis of Heterogeneity of HWTX- I Expressed in *Pichia pastoris*

聂东宋[†], 周延凯[†], 曹佐英, 刘 宇*

NIE Dong-Song[†], ZHOU Yan-Kai[†], CAO Zuo-Ying and LIU Yu*

湖南理工学院化学化工系, 岳阳 414000

Department of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan Institute of Science and Technology, Yueyang 414000, China

摘 要 为了寻找毕赤酵母表达虎纹捕鸟蛛毒素- I (HWTX- I) 时产生不均一性表达产物的原因, 应用阳离子交换层析、反相 HPLC、Tricine SDS-PAGE 电泳、质谱等技术, 对基因工程菌 *Pichia pastoris* GS115/HWTX- I 表达的不均一产物进行了分离、纯化和鉴定, 并对不均一产物的 N 端和 C 端进行测序, 结果表明, 表达产物的不均一性主要体现在重组 HWTX- I 的 N 端信号肽加工的不完全以及 C 末端的内部降解。生物学活性分析表明该不均一产物的活性仅为天然 HWTX- I 活性的 30%。同时, 对如何避免不均一性表达产物的产生提出了相应的对策。

关键词 毕赤酵母, 重组虎纹捕鸟蛛毒素- I, 不均一性, 基因工程

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306(2006)02-0215-05

Abstract To seek the reason of heterogeneity of recombinant HWTX- I (rHWTX- I) expressed in *Pichia pastoris*. We expressed HWTX- I gene of interest in *Pichia pastoris* GS115/HWTX- I. The heterogenous product expressed was separated, purified and identified by using Ion exchange HPLC, reverse HPLC, Tricine SDS-PAGE and MALDI-TOF Mass Spectrometry and then sequenced in both N-terminus and C-terminus. These results show that the heterogeneity of rHWTX- I results from the incomplete processing of signal peptide of N-terminus and the internal degradation of C-terminus. Biological activity assay shows that the activity of the heterogenous rHWTX- I only showed 30% activity compared with the native HWTX- I. The Solutions to how to avoid the heterogeneity are also discussed.

Key words *Pichia pastoris*, recombinant HWTX- I, heterogeneity, genetic engineering

虎纹捕鸟蛛毒素 I (HWTX- I) 是从虎纹捕鸟蛛毒腺中分离得到的一种神经毒肽, 由 33 个氨基酸残基组成, 含 3 对二硫键。对其生物学活性的研究表明, 它是一种作用于突触前膜的神经毒素且是一种 N-型 Ca^{2+} 通道的阻断剂, 最近发现它有明显的镇痛

活性, 可望开发成一种新型的镇痛药物^[1]。但由于虎纹捕鸟蛛分布范围窄小, 仅靠天然资源远不能满足对毒素的全面研究和开发利用的需要。采用蛋白质固相合成的方法也可以得到 HWTX- I, 但每次合成量有限, 并且试剂昂贵, 成本很高。因此, 需要寻

Received: October 10, 2005; Accepted: December 19, 2005.

This work was supported by a grant from the National Science Foundation (No. 39570392).

* Corresponding author. Tel: 86-730-8648549; E-mail: ndz1997@126.com

†: They are co-first authors.

国家自然科学基金项目 (No. 39570392) 资助。

找更为经济实用的方法以便大量地获得这种毒素。尽管用原核生物已成功表达了 HWTX- I 基因^[2], 但其产率很低, 无法达到实用的目的。甲醇营养型酵母(*Pichia Pastoris*)表达体系是一种最近开发出的极具潜力的真核表达体系, 该系统具有高表达, 高分泌, 高稳定的特点, 许多蛋白在该系统中都得到了成功的表达。但是, 酵母表达系统也有其局限性, 包括聚合体的存在, 信号肽加工不完全, 以及内部降解等现象, 这给酵母表达产物的纯化和工业化带来困难。我们用毕赤酵母成功表达了 HWTX- I^[3], 但是除正确的加工表达产物外, 表达产物中还含有不均一组分。本文分析了毕赤酵母表达 HWTX- I 时产生不均一性产物的原因, 并对如何避免不均一产物的产生提出了相应的对策。

1 材料与方法

1.1 材料

基因工程菌株 *Pichia pastoris* GS115/HWTX- I 为本室构建, 低分子量标准购自 Promega 公司, 蛋白胨和酵母提取物购自上海生工公司, YNB(W/O amino acid) 为 DIFCO 公司产品, 蛋白含量测试盒 BCA200™ Protein Assay Kit 购自 PIERCE 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 方法

1.2.1 重组 HWTX-I 的诱导表达: 将 HWTX-I 表达菌株 *P. pastoris* GS115/HWTX-I 接种于 2mL YPD 中 (10g/L 酵母提取物, 20g/L 蛋白胨, 20g/L 葡萄糖) 试管中 30℃ 250r/min 培养过夜。再以 1% (体积比) 量接种入含 100mL BMGY (10g/L 酵母提取物, 20g/L 蛋白胨, 0.1mg/L 磷酸钾缓冲液 pH6.0, 13.4g/L YNB, 4×10^{-4} g/L 生物素, 10g/L 甘油) 的 500mL 三角瓶。30℃ 250r/min 培养至 A_{600} 3 ~ 6。室温 (25℃) 5000r/min 离心 5min, 收集菌体并用 20mL BMMY (BMGY 中 10g/L 甘油由 5mL/L 甲醇代替) 重悬细胞后 25℃ 300r/min 诱导 6d, 每 24h 补加甲醇至 5mL/L, 最后 4℃ 12000r/min 离心 20min 收集发酵上清液, 并加入 PMSF 至 1mmol/L, -70℃ 冻存。

1.2.2 Tricine SDS-PAGE 鉴定: Tricine SDS-PAGE 参照 Schagger^[4] 的方法进行, 分离胶浓度为 16.5%, 浓缩胶浓度 3%, 恒压 100V 电泳 4h 后, 以含 0.25% 的考马斯亮蓝的 12% 的醋酸进行固定和染色。

1.2.3 CM 阳离子交换 HPLC 纯化: CM 阳离子交换 HPLC 纯化在 water™ 650E Advanced Protein

Purification System 上进行, 阳离子交换柱为 Protein-PaK™ CM (5mm × 50mm) 柱, 280nm 下检测, 用 0.1mol/L pH7.0 的磷酸钾缓冲液平衡柱 1h, 0 ~ 1mol/L NaCl 线性梯度洗脱, 收集各峰。

1.2.4 C₁₈ 反相 HPLC 纯化: 10u YWG C₁₈ (3.9mm × 300mm) 柱, 在 Waters Millennium 2010 HPLC 仪上进行, 取 CM 阳离子交换所得的各峰, 以 10% ~ 40% 乙腈 - 0.1% TFA 梯度洗脱, 收集各峰并进行质谱检测。

1.2.5 C 末端分析: 取经纯化为单一组分的分子量为 4.048kD 的表达产物 100μg, 加入 1mg 过量的 DTT, 再加入 200μL 0.5mol/L 的 N-甲基吗啉 (NEM, pH8 ~ 9) 和 1mg 的碘已酰胺混匀后, 室温静置 1h, 然后用反相 HPLC 纯化被碘已酰胺修饰的样品并进行质谱鉴定, 将被碘已酰胺修饰后的分子量为 4.396kD 的组分分装, 每管约 500pmol, 羧肽酶 Y (CPY) 分装成每管 2u, 抽干后备用。反应前将样品物质加 ddH₂O 溶解成 15 ~ 20pmol/uL, CPY 加 ddH₂O 溶解成 5×10^{-3} u/μL, 反应时根据样品性质的不同将样品与酶以 3:1 ~ 1:1 的比例混合, 在室温下用羧肽酶 Y 酶解样品, 每隔 30s 取样做质谱分析。

1.2.6 质谱鉴定: 在 Bruker 公司 ProFlex III 型 MAL2DI2TOF 质谱仪上进行, 基质液为 CCA (α-氰基 4-羟基肉桂酸), 在含 0.1% TFA 的 30% 的乙腈中的饱和溶液按 1:10 将经过阳离子交换及反相 HPLC 纯化的样品与基质液混合后, 取 1.5μL 加样到不锈钢点样盘上, 于室温自然干燥后进行质谱分析, 分别以 ACTH 的一个片段 (2466.7m/z) 为内标与外标校正, 加速电压为 20kV, 用阳离子模式分析。

1.2.7 生物活性检测: 参照 Sally A. Waterman^[5] 方法进行。小白鼠脱颈椎致死死后剥离输精管标本, 将剥离的输精管浸入 3mL 通有 95% O₂ 和 5% CO₂ 混合气体的 Krebs 溶液中, 固定后加入纯化的重组 HWTX-I, 每间隔 30s 给予刺激一次, 用二道生理记录仪记录其阻断强度。

2 结果

2.1 CM 阳离子交换

利用 BMMY 培养基培养 *P. pastoris* 生产重组 HWTX-I, HWTX-I 分泌到培养上清液中, 其中含有大量的杂蛋白及色素分子及其它成份, 超滤脱盐后的样品经 CM 阳离子交换后得到三个峰 (图 1), 其中 F1 峰为不被吸附的杂蛋白和大量黄色色素分子, F3 峰为正确的表达产物, F2 峰为内部降解产物。F2 峰

的组分经 16.5% 的 Tricine SDS-PAGE 鉴定为一条带 (图 2)。质谱结果显示为单一峰。

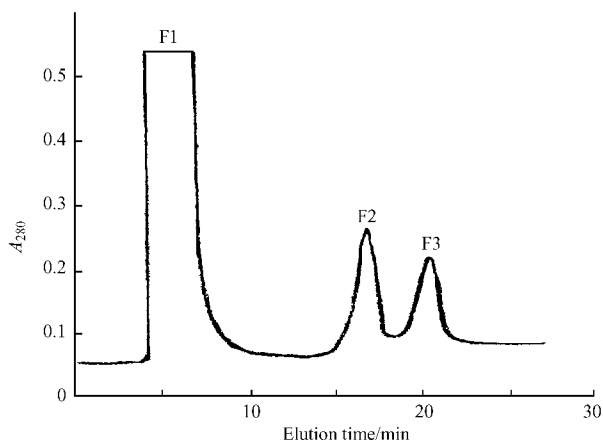


图 1 表达上清液脱盐后的阳离子交换图

Fig. 1 Ion exchange HPLC of desalted supernatant

Desalted supernatant was applied to a CM ion exchange column (5mm × 50mm) initially equilibrated with 0.001mol/L sodium phosphate buffer, pH7.0 the column was eluted with a linear gradient of 0 ~ 100% of 1mol/L sodium chloride over 40min at a flow rate of 0.7mL/min.

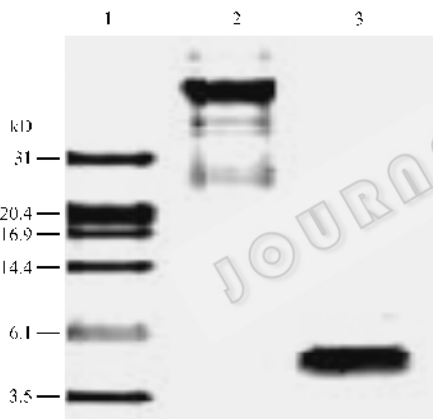


图 2 16.5% 的 Tricine-SDS PAGE 分析阳离子交换纯化产物 F1 和 F2 峰

Fig.2 16.5% SDS-PAGE analysis of peak F1 and F2 purified by Ion exchange HPLC

Lane 1 : Molecular marker ; Lane 2 : Peak F1 ; Lane 3 : Peak F2.

2.2 反相 HPLC 纯化

阳离子交换峰 F2 仍含大量的盐分,不利于活性测定。故对其进行反相 HPLC C₁₈ 进一步脱盐纯化,图 3 显示为单一峰,质谱显示结果(图 4)表明,其相对分子质量为 4.049kD,与预期结果 4.289kD 少了 0.24kD。

2.3 C 末端分析

分子量为 4.048kD 的表达产物经还原剂 DTT 打开二硫键,再用碘乙酰胺保护巯基,然后用反相 HPLC 纯化被碘乙酰胺修饰的样品,质谱鉴定结果

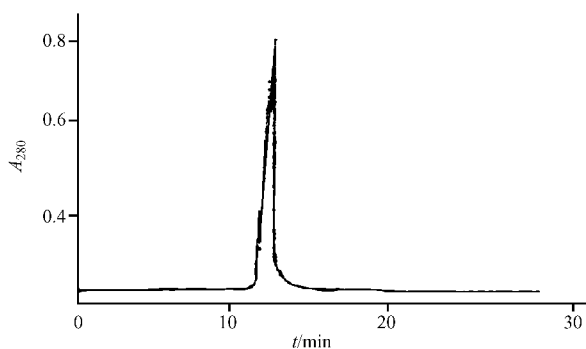


图 3 阳离子交换纯化产物 F2 峰的反相 HPLC 纯化

Fig.3 Purification of peak F2 by reversed phase HPLC

The ion exchange HPLC fraction eluting at 16.82min (Fig.1) was applied to a YWGC₁₈ (3.9mm × 300mm) initially equilibrated with 0.1% trifluoroacetic acid in water(buffer A). Elution was performed with a linear gradient of 0 ~ 40% buffer B(acetonitrile containing 0.1% trifluoroacetic acid) over 40min at a flow rate of 0.7mL/min.

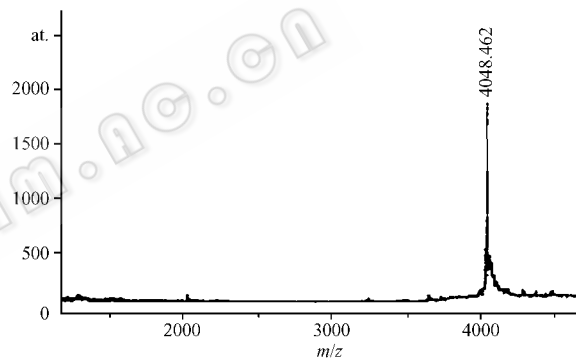


图 4 反相 HPLC 纯化产物的质谱分析

Fig.4 MALDI-TOF Mass Spectrometry analysis of the product purified by rHPLC

表明:其分子质量由 4.048kD.46 增加到 4.396kD(图 5)这是由于 6 个巯基上的氢被碘乙酰胺替代后的结果(4.048kD.46 + 0.058 × 6 = 4.396kD)。也说明 4.048kD.46 组分的 6 个 Cys 残基全部被碘乙酰胺修饰。在室温下用羧肽酶 Y 酶解样品,每隔 30s 取样做质谱分析,由图 6 可见 C 末端的第一个残基为 W (4.396kD - 4.209kD = 0.187kD),第二、三个残基为 CK (4.209kD - 3.921kD = 0.287kD (0.103kD + 0.058kD + 0.128kD)),由此可见 4.048kD 组分的 C 末端比天然的 HWTX-I 缺失了 KL 两个残基。

2.4 N-端分析

该组分的 N 端的 24 个残基的序列测定结果如下:YVEF※ACKGVFDCTPGKNECCPNR..... 结果表明 N 端除了 YVEF 这 4 个由于 α-factor 信号肽加工后留下的残基外,其余 20 个残基与天然的 HWTX-I 的序列完全一致。

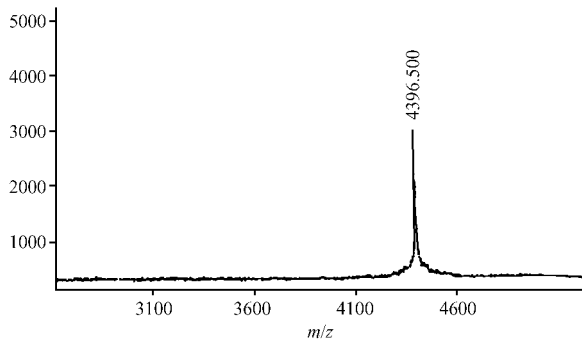


图5 分子量为4.048kD的组分经碘乙酰胺修饰后的质谱图

Fig.5 MALDI-TOF Mass Spectra of rHWTX-I (4.048kD)

modified by iodoacetamide

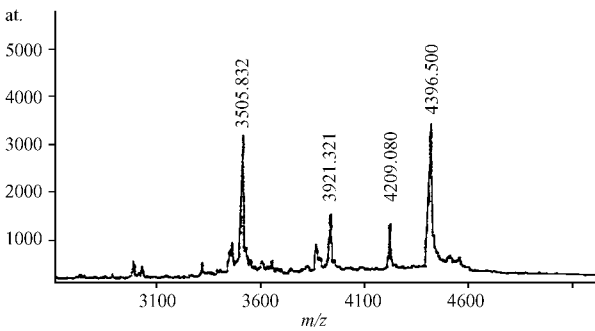


图6 4.396kD组分经羧肽酶Y酶切后的质谱图

Fig.6 MALDI-TOF Mass Spectra of the C-terminal of rHWTX-I

(4.396kD) after being digested by carboxypeptidase Y

2.5 生物学活性分析

4.048kD组分对膈神经膈肌接头传递的抑止作用见表1。由表可见,C-末端丢失了二个残基以后,其神经活性下降了70%,说明C末端对于其发挥正常的生物学功能起着一定的作用。

表1 4.048kD组分和天然HWTX-I对小鼠膈神经膈肌接头传递的影响($n=3$)Table 1 Effects of 4.048kD and natural HWTX-I on the neuromuscular transmission of isolated mouse phrenic nerve-diaphragm preparation ($n=3$)

Peptide	Concentration (g/L)	Blockage time (min)	Relative activity/%
Natural HWTX-I	5×10^{-5}	18	100%
4.048kD composition	5×10^{-5}	62	30%

3 讨论

甲醇酵母表达体系虽然具有繁殖速度快,能进行高密度发酵、高表达、高分泌及翻译后加工等优点,但该表达系统也有其局限性,其中表达产物的不均一性尤为突出,不均一性具体表现在以下三个方面(1)由于表达的外源蛋白的聚合体的存在而影响产率,这些聚合体不溶复合物的存在可能是由于高

表达量的重组蛋白的积累而产生的沉淀现象,也可能由于某个阶段蛋白质分子之间的离子键,疏水键或共价键起作用的结果^[6]。(2)信号肽加工不完全。Singh等^[7]报道了酵母表达人 α 干扰素时所分泌的产物N端含有8个多余的氨基酸,其中4个是由加到干扰素基因上的DNA序列编码的,4个来源于酵母 α 因子的前导肽序列,但仍保留干扰素的活性。我们在表达HWTX-I时,发现rHWTX-I的N端比天然HWTX-I多了4个氨基酸残基,这是由于表达产物被Stel3信号肽酶加工后留下的 α 因子前导肽上的4个残基,但仍然保留70%~80%的天然毒素活性。(3)内部降解。我们在表达HWTX-I时,除了正确的表达产物4.289kD的成分外,还分离得到了4.048kD的组分,该组分经C末端序列测定表明缺失了2个氨基酸(KL)。这是由于用甲醇酵母作为宿主发酵生产重组蛋白时,宿主细胞本身会在培养过程中产生能降解目的蛋白的羧肽酶,甲醇酵母细胞的液泡中含有蛋白酶A、蛋白酶B和羧肽酶Y等蛋白水解酶,其中的羧肽酶Y能将其C末端的KL切割。Heim J等^[8]在用甲醇酵母表达水蛭素也发现重组水蛭素中含有正确加工序列和C末端缺失的不均一加工产物,但两者均有抗凝活性,说明小分子多肽在*P. pastoris*中表达后降解尤为明显。我们用毕赤酵母表达的分子量为4.048kD的不均一组分的活性为天然毒素的30%左右,廖黔宁等^[9]用固相Fmoc化学合成的方法合成了一个C末端缺失4个氨基酸残基的HWTX-I的28肽类似物,活性测定结果表明该类似物能阻断小鼠膈神经-膈肌的突触传递,但阻断时间延长为67.2min,相当于天然毒素活性的27%左右。该结果与我们的实验结果相符,说明C末端的氨基酸残基与HWTX-I的生物学活性有关,但不是HWTX-I活性中心的关键残基,因为如果活性中心的残基改变则会导致功能的大幅度下降,甚至活性的完全丧失。为了避免表达产物的内部降解,我们在用*P. pastoris*表达HWTX-I时发现通过改变诱导的起始pH值至3.0;添加蛋白酶抑制剂;采用BMMY培养基和将诱导温度下调至25℃不仅可以抑制本底蛋白的表达,而且可以减少目的蛋白的降解^[3]。此外还可以通过改造*P. pastoris*表达宿主菌株,缺失基因组中主要蛋白水解酶的基因,使目的蛋白免受降解。或者采用已有的蛋白酶缺陷菌株如SMD1168(his4 pep4 λ) SMD1165(his4 prb1)来避免表达产物的降解。

REFERENCES(参考文献)

[1] Liang SP , Chen XD , Shu Q *et al.* The prosynaptic activity of huwentoxin-I , a neurotoxin from the venom of the chinese bird spider *Selenocosmia huwena* . *Toxicon* 2000 **38** (9) :1237 - 1246

[2] Li M , Li LY , Wu XS *et al.* Cloning and functional expression of a synthetic gene encoding huwentoxin-1 , a neurotoxin from the Chinese bird spider (*Selenocosmia huwena*) . *Toxicon* 2000 **38** :153 - 162

[3] Nie DS(聂东宋) , Li M(李敏) , Xu FM(徐辉明) *et al.* Expression and purification of recombinant huwentoxin-1 in *Pichia pastoris* . *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报) 2002 , **18** (2) :172 - 177

[4] Schagger H , Jagow GV. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100kD. *Analytical Biochemistry* ,1997 , **166** : 368 - 379

[5] Waterman SA. Role of N- , P-and Q-type voltage-gated calcium

channels in transmitter release from sympathetic neurones in the mouse isolate was deference. *British Journal of Pharmacology* , 1997 , **120** 393 - 398

[6] Marston FAO , The purification of eukaryote polypeptides synthesized in *E. coli* . *J Biochem* ,1996 **240** :1 - 5

[7] Singh A , Lugovoy JM , Kohr WJ *et al.* Synthesis , secretion and processing of α -factor-interferon fusion protein in yeast. *Nucleic Acid Res* ,1984 , **12** 8927 - 8933

[8] Heim J , Takabayashik , Meyhack B. C-terminal proteolytic degradation of recombinant desulfato-hirudin and its mutants in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* . *Eur J Biochem* ,1994 , **226** :341 - 353

[9] Liao QN(廖黔宁) , Luo JQ(罗静初) , Liang SP(梁宋平) . Solid-phase chemical synthesis and bioactivity identification of the 28 residue analogue of Huwentoxin-1. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*(中国生物化学与分子生物学学报) , 1999 , **15** (5) :756 - 761