

· 生物技术与方法 ·

蜘蛛多肽毒素 JZTX-51 和 JZTX-26 的重组表达和纯化

邵婕, 潘娇, 瞿芳, 刘子昊, 丁易颖, 罗莎, 张学文, 陈金军

湖南农业大学 生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128

邵婕, 潘娇, 瞿芳, 等. 蜘蛛多肽毒素 JZTX-51 和 JZTX-26 的重组表达和纯化. 生物工程学报, 2018, 34(10): 1668–1678.

Shao J, Pan J, Qu F, et al. Recombinant expression and purification of spider toxin, JZTX-51 and JZTX-26, from *Chilobrachys jingzhao*. Chin J Biotech, 2018, 34(10): 1668–1678.

摘要: 为建立一种简便、快速且能大量获得富含二硫键的蜘蛛多肽毒素 JZTX-26 (35 aa) 和 JZTX-51 (27 aa) 的有效方法, 利用 PCR 的方法克隆成熟肽编码基因并插入至大肠杆菌 *Escherichia coli* 表达载体 pMAL-p2x 中与 MBP (麦芽糖结合蛋白) 标签融合, 构建重组表达质粒 pMAL-jz26 和 pMAL-jz51。在受体菌 TB1 和 BL21 (DE3) 中对两个重组表达质粒分别进行 IPTG 诱导表达, 通过 Amylose 亲和层析柱纯化并进行 SDS-PAGE 分析; 采用因子 X 对融合蛋白进行酶切后通过分子筛以及反相高效液相色谱对两种重组蛋白进行纯化。通过 MALDI-TOF-TOF 质谱鉴定, 表达产物的分子量与预期的多肽理论分子量一致。1 L 表达培养液中能获得大约 5 mg 纯化的目的蛋白 JZTX-26 或 JZTX-51。结果表明利用该原核表达体系可对蜘蛛毒素基因 *jztx-26* 和 *jztx-51* 进行融合表达, 并对重组蛋白进行亲和层析, 为采用基因工程的手段大量获得蜘蛛多肽毒素奠定了基础。

关键词: 蜘蛛毒素, 原核表达, 融合蛋白, DRG 细胞, 钠离子通道

Recombinant expression and purification of spider toxin, JZTX-51 and JZTX-26, from *Chilobrachys jingzhao*

Jie Shao, Jiao Pan, Fang Qu, Zihao Liu, Yiyang Ding, Sha Luo, Xuewen Zhang, and Jinjun Chen

College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China

Abstract: To establish a simple, quick and effective method to get a large amount of spider toxin JZTX-26 (35 aa) and JZTX-51 (27 aa) with 3 disulfide bonds each, the mature peptides coding gene fragments were constructed and fused with maltose-binding protein (MBP) tag in an *Escherichia coli* expression vector pMAL-p2x. The recombinant constructs pMAL-jz26 and pMAL-jz51 were transformed and cultured in *E. coli* TB1 and BL21 (DE3). After being induced by

Received: December 29, 2017; **Accepted:** June 20, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31672457, 31772865), Educational Commission of Hunan Province, China (No. 16A098), Science Commission of Hunan Province, China (No. 2017NK2311), the Students Innovation Project of Hunan Agricultural University (No. XCX17071).

Corresponding author: Jinjun Chen. E-mail: chhncjj@126.com

国家自然科学基金 (Nos. 31672457, 31772865), 湖南省教育厅重点项目 (No. 16A098), 湖南省科技厅重点项目 (No. 2017NK2311), 湖南农业大学大学生创新项目 (No. XCX17071) 资助。

网络出版时间: 2018-07-23

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20180723.0933.001.html>

isopropyl- β -d-thiogalactoside (IPTG), the periplasmic proteins were purified by amylose affinity chromatography and analyzed by SDS-PAGE. The fusion proteins were digested with factor X, and purified by Sizes-Exclusion chromatography and Reversed Phase HPLC. Molecular weights of the purified peptides were obtained by using a MALDI-TOF-TOF mass spectrometer, which were consistent with the theoretical molecular weights. Five milligram of target protein could be purified from 1 L of culture medium. The results indicate that the peptides with three disulfide bonds can be expressed by using the prokaryotic expression system with MBP tag. Our findings suggest the possibility of genetic engineering to obtain large amount of spider peptide toxins.

Keywords: spider toxin, prokaryotic expression technology, fusion protein, DRG cell, sodium channel

动物毒液是有重要研究价值的生物活性物质,许多深入研究的毒素多肽、蛋白已成为开展神经生物学、细胞生物学和蛋白质化学基础理论研究、天然创新药物开发以及农业生物技术应用的良好材料^[1-3]。然而,天然节肢动物肽类毒素资源有限,生化分离和纯化过程繁琐且得率低,化学合成成本高,且不易大规模生产。随着分子生物学的发展,生物合成为毒素研究开辟了一条新的途径。大肠杆菌表达系统是目前最为成熟也是应用最广泛的原核表达体系,具有遗传背景清楚、操作简便、便于大规模生产等优点^[4]。但是,采用大肠杆菌表达系统表达外源蛋白,会造成一些不溶性包涵体的形成,这些包涵体会阻碍蛋白的表达。为提高靶蛋白的可溶性表达效率,将靶蛋白与一些易于表达和纯化的标签进行融合表达,常用的表达标签有:MBP(麦芽糖结合蛋白),TRX(硫氧还蛋白),GST(谷胱甘肽-S-转移酶),SUMO(小泛素相关修饰蛋白)和 HaloTag 蛋白,GB1(链球菌 G 蛋白 B1 结构域)^[5-7]。Zhu 等提供了在大肠杆菌重组表达系统中合成 α -芋螺毒素 LvIA 的有效方法^[8]。Moon 等在大肠杆菌表达体系中成功表达了笋螺毒素 Tgu6.1,并检测证明对沙蚕有麻痹作用^[9]。

蜘蛛种类繁多,而且不同蜘蛛的毒液所含成分及其性质差别很大,因此,蜘蛛毒液是一个巨大的发现新的潜在生物活性分子的重要资源。敬钊缨毛蛛 (*Chilobrachys jingzhao*, *Chilobrachys guangxiensis*) 是在我国海南省琼中县境内发现的,属捕鸟蛛科 (Theraphosidae)、棒刺蛛亚科

(Selenocosmiinae)、缨毛蛛属 (*Chilobrachys*)。敬钊缨毛蛛雌、雄个体都较大,体型与海南捕鸟蛛和虎纹捕鸟蛛相似,背甲红褐色,密布灰白色细毛,边缘具较长而且粗的硬毛,腹部浅黄褐色,有稀疏的棕色长毛和浓密的浅黄褐色短细毛,穴居地下,主要以昆虫和其他节肢动物、蚯蚓、蜗牛或小型脊椎动物为食。该蜘蛛毒腺中的粗毒好比一个丰富的毒素肽库,具有大量的毒素肽物质。通过对敬钊缨毛蛛毒腺转录组和多肽组的研究,获得大量毒素的分子遗传学数据,发现了 104 个新型毒素分子^[10-12]。目前,关于敬钊缨毛蛛毒素的研究主要集中在其作为修饰剂对离子通道的作用^[13-20]。而由于蜘蛛毒液的量非常少,每只蜘蛛每次取毒仅 10 μ L 左右,而其中包含上百种成分,因此,重组表达获得活性多肽的技术成为尤其重要的途径^[21-24]。pMAL-p2x 是一种原核分泌型表达载体,能在大肠杆菌中实现高效分泌表达。pMAL-p2x 的 5'端带有一段信号肽与麦芽糖结合蛋白的融合蛋白,将表达产物分泌到大肠杆菌的胞间质,以可溶的形式存在^[25-29]。文中以敬钊缨毛蛛毒素中的两个多肽为主要目标蛋白,MBP 为融合伴侣和纯化标签,构建到原核表达载体 pMAL-p2x 上,通过原核表达途径实现了敬钊缨毛蛛毒素的基因工程高表达,为采用基因工程的手段大量获得蜘蛛毒素奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菌株:大肠杆菌 *Escherichia coli* 菌株 DH5 α 、

BL21 (DE3)和 TB1 为本实验室保存。

质粒：原核细胞融合表达载体质粒 pMAL-p2x 由中山大学皮灿辉博士惠赠。

实验动物为 Sprague-Dawley 品系大白鼠，简称 SD 大鼠，由湖南师范大学生物化学与分子生物学实验室动物房饲养提供。

培养液：DMEM 干粉 288 mg+NaCl 43 mg。溶于 20 mL 双蒸水后，用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.40。如果 DMEM 中不含 HEPES，则需要按体积比 2:1 的比例加入。溶液配好后用 99.9% 的氧气饱和 10 min，并于 34 °C 水浴预热备用。

消化液：含胶原酶 (Collagenase IA 3.7–4.3 mg)、胰蛋白酶 (Trypsin, 1.7–2.0 mg) 和脱氧核糖核酸酶 (Dnase IV, 0.3 mg)。用上述 5 mL 充氧饱和的 DMEM 液体溶解，并于 34 °C 水浴预热备用。

消化抑制剂：胰蛋白酶抑制剂 (Inhibitor)，5.5–7.6 mg。

试剂：限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、10×缓冲液购自深圳晶美公司；QIAGEN DNA 胶回收试剂盒购自安比奥公司；TIANGEN 的普通 DNA 产物纯化试剂盒，DNA ladder 购自宝生物公司；低分子标准蛋白 (14 000–97 000) 购自华美生物公司；超低分子标准蛋白 (2 060–81 000) 购自鼎国公司；Factor Xa 蛋白酶购自 Novagen 或 GE 公司；异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG)、丙烯酰胺 (Ultra Pure Grade)、N,N-亚甲双丙烯酰胺 (Ultra Pure Grade)、过硫酸铵、N,N,N,N'-四甲基乙烯二胺、考马斯亮蓝 R-250、考马斯亮蓝 G-250、β-巯基乙醇、DTT、SDS、甘氨酸、Tricine 和 Tris 碱等均购自 AMRESCO 公司；三氟乙酸 (TFA) 为 ALDRICH 公司产品，购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司；DMEM 干粉、胶原酶、胰蛋白酶、脱氧核糖核酸酶和胰蛋白酶抑制剂购自 Sigma 公司；氨苄青霉素钠盐购自华北制药厂；胰蛋白胨和酵母提取物购自 Oxoid 公司；PCR 扩增 *jztx-26* 和 *jztx-51* 基因引物由生工生

物工程 (上海) 股份有限公司合成；其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 载体制备

活化 *E. coli* DH5α (pMAL-p2x)，根据质粒小提试剂盒 (离心柱型) 说明书的步骤，提取质粒 pMAL-p2x，置于 -20 °C 中保存备用。

Xmn I 和 *Hind* III 酶切质粒，根据普通 DNA 产物纯化试剂盒 (离心柱型) 说明书的步骤进行纯化。

1.3 *jztx-26* 和 *jztx-51* 基因的克隆与测序

为了简便有效地获得目的基因进行蛋白的原核表达，我们根据蜘蛛毒素的氨基酸序列和大肠杆菌的密码子偏好性合成了相应的基因。针对原核表达载体 pMAL-p2x 设计克隆蜘蛛毒素基因 *jztx-26* 和 *jztx-51* 的引物，5'端将进行平末端化，在 3'端引入酶切位点 *Hind* III。所设计的引物序列如表 1 所示。

采用 PCR 方法扩增 *jztx-26* 和 *jztx-51* 基因，PCR 体系组成如下：无菌 ddH₂O 38.1 μL；10×PCR 缓冲液，5.0 μL；25 mmol/L MgCl₂，2 μL；cDNA，0.5 μL；Taq 酶，0.4 μL；总体积 50.0 μL。PCR 反应的条件为：94 °C 预变性 5 min；94 °C 变性 1 min，54 °C 退火 1 min，72 °C 延伸 1 min，30 个循环；72 °C 延伸 5 min。反应结束后，用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。T4 DNA 聚合酶形成平末端：

表 1 表达的毒素基因引物序列

Table 1 Primers of toxin genes to be expressed

Primer name	Primer sequence (5'-3')
UP51	CGTTGCGAACCGTCCGGCAAACCG TGTCGTCCGCTGATGCGTATCC
LP51	CCCAAGCTTAGCGCATTACACAGA ACGCAGGAGCCAC
UP26	GACGACTGCCTGGGCCTGTTCTCCT CTTG
LP26	CCCAAGCTTACCACAGTTTCAGTTT ACACCATTTGTCACGACGGTTAC

PCR 纯化产物 44 μL ; 缓冲液 2.5 μL ; BSA 0.5 μL ; dNTPs 0.2 μL ; T4 DNA 聚合酶 0.5 μL , 置于 12 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中 15 min。按试剂盒说明纯化以上核酸后, *Hind* III 酶切, 通过 1.7% 低熔点胶电泳进行分离, 并进行切胶回收目的片段, 回收产物与 pMAL-p2x 载体在 16 $^{\circ}\text{C}$ 过夜连接, 连接产物转化, 在含氨苄青霉素的培养基上进行筛选, 随机挑取单菌落进行菌落 PCR, 筛选出阳性克隆, 由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序鉴定。

1.4 目的蛋白 JZTX-26 和 JZTX-51 的表达

表达流程如图 1 所示。将重组表达质粒分别转化 DH5 α 、TB1 和 BL21(DE3) 三种感受态细胞, 挑取转化后的单菌落于含葡萄糖的 5 mL 富营养培养基(含 0.1 mg/mL Amp) 的试管中培养过夜, 次日按比积以 1:100 的比例在 500 mL 同样的培养基里放大培养至 OD_{600} 值 0.4–0.6 之间时, 加入 IPTG 至终浓度为 6×10^{-4} mol/L, 诱导表达 4–6 h。

利用蔗糖梯度渗透压改变裂解细胞壁, 由于目的蛋白与 MBP 融合表达, 因此可与 Amylose 树脂亲和吸附, 然后用麦芽糖进行洗脱, 收集洗脱峰, 得到该融合蛋白的初步纯化产物, 并测定蛋白浓度。

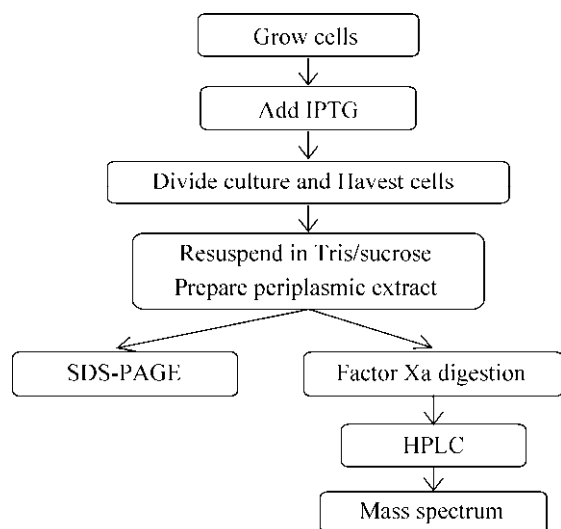


图 1 蛋白融合表达流程图

Fig. 1 Flow chart for fusion expression.

1.5 Amylose 亲和层析柱纯化、透析及 SDS-PAGE 分析

将亲和纯化得到的溶液进行透析, 除去溶液中的小分子蛋白及盐类物质, SDS-PAGE 分析。然后冻干, 以备酶切。

1.6 酶切、分子筛纯化及反相色谱纯化

将冻干得到的融合蛋白用 Factor Xa 进行酶切, 切去前面的 MBP, 采用分子筛进行分离。将浓缩后的样品, 采用 C18 反向柱 (10 mm \times 250 mm) 进一步纯化。反相得到的洗脱峰经质谱鉴定后, 取其中与目的蛋白理论分子量一致的峰进行冻干以备活性鉴定。

1.7 JZTX-26 和 JZTX-51 对 DRG 钠离子通道电流的影响

挑选出生 4 周左右, 体重约为 140–200 g 的 SD 大鼠, 麻醉后断颈处死, 迅速挑出脊椎并将其剪成 2–4 段, 将椎管沿与肋骨垂直的方向剪开, 然后在盛有少量培养液的烧杯中浸泡椎管, 仔细撕破附在椎管内壁上的无色黏膜, 暴露椎管和肋骨交汇处的背根神经纤维。在胸椎和腰椎部分, 可挑选 10–15 个较好的背根神经节放入装有 2 mL 临时培养液的培养皿中。分离出神经节以及神经纤维后, 用维纳斯剪切除神经节外的絮状物和轴索, 放入盛有约 0.5 mL 临时培养液的培养皿中。倒去临时培养液, 用维纳斯剪将分离的神经节剪碎。然后将剪碎后神经细胞转入含有 15 mL 消化液的指形管中, 在 34 $^{\circ}\text{C}$ 、110 r/min 的环境中用消化液酶解 20–30 min。酶解期间每隔 8–10 min 取出指形管吹打细胞以防细胞成团, 酶解终止后向消化液中加入胰蛋白酶抑制剂, 终止酶解反应。将酶解后的溶液转入离心管中离心 (1 000 r/min, 2–5 min), 去除上清。用含 10% 小牛血清的培养液重悬细胞, 重悬后的细胞分成 3–4 皿, 每皿加入 2 mL 培养液, 放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 (5% CO_2 , 95% 空气) 中, 培养 3–4 h 后可用于记录电流。

倒置显微镜下选择细胞膜较为光滑、细胞质均匀的细胞，在室温 20–25 °C 条件下进行膜片钳实验。选用 100 μ L 硼硅酸盐玻璃毛细管为玻璃电极材料，待电极与细胞膜之间形成高阻抗的京欧 ($G\Omega$) 封接后，补电极快电容。然后将细胞钳制在 -60 mV，给予一短而有力的负压，将钳制在电极中的细胞膜迅速打破，再补偿细胞慢电容。形成全细胞记录模式后将细胞钳制为 -80 mV，细胞稳定 4–6 min 开始记录电流。

2 结果与分析

2.1 JZTX-26 和 JZTX-51 基因序列及分析

目的蛋白基因来源于蜘蛛毒素 cDNA 文库^[11]。两个毒素的前体都含有信号肽、中间肽和成熟肽 (图 2、图 3)。JZTX-26 成熟肽 (35 aa) 和 JZTX-51 成熟肽 (27 aa) 均含 3 对二硫键，但两者的序列同源性非常低，分属于两个不同家族。根据同源性分析，确定两个多肽均为 ICK 分子，二硫键的连接方式分别为：JZTX-51：C₂-C₁₈，C₉-C₂₁，C₁₇-C₂₆；JZTX-26：C₃-C₁₈，C₁₀-C₂₃，C₁₇-C₃₀^[11]。本实验是将成熟肽序列分别构建到表达载体 pMAL-p2x 上。

2.2 重组表达载体 pMAL-jz26 和 pMAL-jz51 的构建

琼脂糖凝胶电泳检验 cDNA 文库片段 *jztx-26* 和 *jztx-51* 的 PCR 扩增，结果如图 4 所示，纯化与预

```
ACGGACGTAGTTAATTTTTTCCTTCGATAAGCAAACAATCACTTCAAACCAATAATGAGC
M T
AGGAAAAATCTTAGCTGTTCTTTTGGTCTTTACTCTGGTTGCGTGCAATAATGCAGAAAAA
R K I L A V L L V F T L V A C N N A E K
TATTCAGAACTGATGTTGAAGACTCACCAATGATTGAGAGAGAAGGTGCGAACCATCA
Y S E T D V E D S P M I Q E R R C E P S
GGCAAACCGTTCGCCCTTATGAGAATACCGTGTGTGGATCTTGGTGGTGGGCAAG
G K P C R P L M R I P C G S C V R G K
TGGCTTGAGCCACGGATTATGGAAAAATTTGTAACACGTTTCTAACTAAGAAAGGAAAAA
C A -
ATGCAATCAAAAAACCAATCTTTTACCAAGACCTGAGTAAGTAACTAGAACTGCGCTTGTATT
```

图 2 JZTX-51 的 cDNA 和氨基酸序列

Fig. 2 Amino acid and cDNA sequence of JZTX-51. The sequence of signal peptide was marked in italic font. The sequence of mature peptide was underlined by solid line.

测大小相符 PCR 产物，用 T4 DNA 聚合酶补齐末端，纯化，用 *Hind* III 酶切，再次纯化备用。

载体制备，将纯化的 pMAL-p2x 质粒分别用 *Xmn* I 和 *Hind* III 先后酶切，纯化备用。

将酶切好的毒素基因片段与线性化载体连接，转化到大肠杆菌感受态细胞 TB1 和 BL21。氨苄青霉素抗性筛选，菌落 PCR 检测阳性克隆 (图 5)，进行测序。将测序正确的克隆分别命名为 pMAL-jz26 和 pMAL-jz51。

2.3 目的蛋白 JZTX-26 和 JZTX-51 的表达

宿主菌 TB1 是该表达系统中配套的表达宿主菌株。而宿主菌 BL21 (DE3) 因所含的内源蛋白酶较少，是用于 *E. coli* 重组表达的通用菌株。比

```
GGTGACTGAAGTACTGATTACCTCTTCTCTATCCGACAAAATTTGGGGAGCTGTATTG
AAATCGCAAGTGAACATGAGGGCTCTTTGATCAITGCTGGATTAGCTCTGTTTTGGTT
M R A L L I I A G L A L F L V
GTTTGCAACGCTTCCAGGTGAACGAGCAAAGCTCGCTGAATGAAGTCTTTCGGCCATA
V C N A S Q V N E Q S S L N E V L S A I
TTTGCTGGAGGAGCCCGAGAAAGAGATGACTGCTTAGGCTTGTTCGTCAATGTAAC
F A V E E P Q E R D D C L G L F S S C N
CCTGACAACGACAAATGCTGTGAAGGCCGTAATGTAATAGAAAGACAAAGTGGTGTAAA
P D N D K C C E G R K C N R R D K W C K
TTGAAATTATGGTAACAACAGCTACTGAACACCAAAAATTTCTTCTTTTACGGATTCAA
L K L W -
AACTGGAAATTTGCACTAAAATGTTATTATTATTAGTAATCTATTACGTATGTAC
```

图 3 JZTX-26 的 cDNA 和氨基酸序列

Fig. 3 Amino acid and cDNA sequence of JZTX-26. The sequence of signal peptide was marked in italic font. The sequence of mature peptide was underlined by solid line.

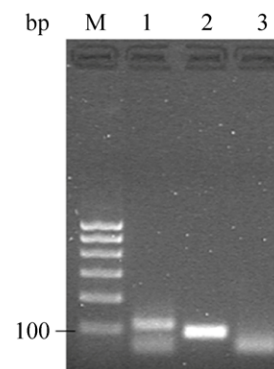


图 4 *jztx-26* 和 *jztx-51* 基因的 PCR 电泳图

Fig. 4 2.0% agarose gel electrophoresis of PCR products of *jztx-26* and *jztx-51*. lane M: 100 bp DNA ladder; lane 1: JZTX-26; lane 2: JZTX-51; lane 3: negve control.

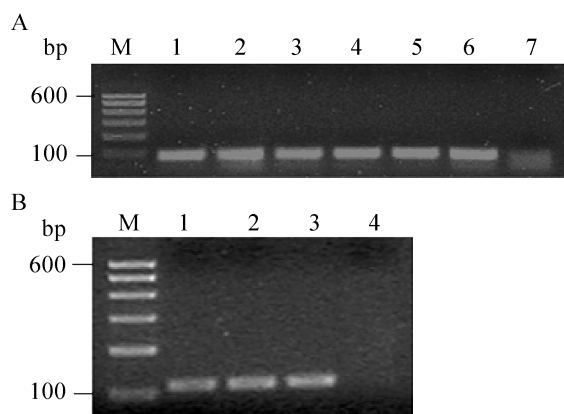


图 5 阳性克隆子菌落 PCR 电泳图

Fig. 5 Colong PCR analysis of recombinants. (A) JZTX-51. lane M: 100 bp DNA ladder; lanes 1–6: recombinants; lane 7: negative control. (B) JZTX-26. lane M: 100 bp DNA ladder; lanes 1–3: recombinants; lane 4: negative control.

较两种宿主菌 BL21 (DE3) 和 TB1 在相同条件下重组蛋白的表达量及可溶性, 结果表明, 两种转化菌都能表达重组可溶性较好的融合蛋白, 宿主菌 BL21 (DE3) 菌株的表达量高, 但是出现 3 条重组蛋白带; TB1 菌株表达的产物都可得到特异的重组蛋白带, 最终我们选择 TB1 作为重组表达用工程菌株。由于表达的小肽富含二硫键, 选用较低浓度的 IPTG, 低温并长时间诱导。当工程菌生长至 $OD_{600}=0.8$ 时, 添加终浓度为 1×10^{-4} mol/L 的 IPTG, 在 24°C 诱导 3 h 左右, 离心收取菌体, 冷冻渗透处理。SDS-PAGE 检测外源蛋白的表达量及可溶性 (图 6)。

2.4 融合蛋白的亲纯化

由于重组敬钊毒素融合蛋白在氨基端有 MBP 标签, 因此可与 Amylose 树脂亲和吸附, 然后用麦芽糖进行洗脱。含 MBP-JZTX 的上清液流过 Amylose 亲和柱, 然后用浓度为 0.01 mol/L 的麦芽糖 (缓冲体系为 0.02 mol/L Tris-HCl, pH 8.0) 溶液洗脱, 收集洗脱峰, 得到该融合蛋白的初步纯化产物, 并采用 BCA 法测定蛋白浓度。初步纯化产物过夜透析, 冻干。

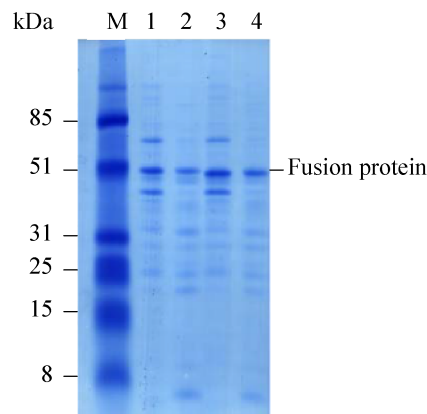


图 6 SDS-PAGE 检测蛋白质表达

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of recombinants expression. lane M: protein marker; lane 1: JZTX-26 expressed by BL21(DE3); lane 2: JZTX-26 expressed by TB1; lane 3: JZTX-51 expressed by BL21(DE3); lane 4: JZTX-51 expressed by TB1.

2.5 融合蛋白的酶切与目的蛋白的纯化

重组敬钊毒素和融合伴侣 MBP 之间有蛋白酶 Factor Xa 的酶切位点。纯化的融合蛋白通过 Factor Xa 蛋白酶切使目的蛋白与融合伴侣分离。经过对酶切实验条件的摸索, 我们最终选择 20°C 作为最适酶切温度。

酶切后的蛋白采用凝胶过滤和超滤手段进行分离纯化和浓缩。由于目的小肽与未切割融合蛋白和融合伴侣体的分子量差别较大, 因此利用分子筛效应, 根据蛋白分子量的大小将蛋白分开。采用 Sepharose G50 分子筛凝胶层析来进行分离, 并检测洗脱液在 280 nm 和 215 nm 处波长的紫外吸收值。经过 Sepharose G50 凝胶过滤层析, 我们检测到 4 个紫外吸收峰, 将这 4 个峰进行质谱检测, 确定第 3 个峰中有与目的多肽一致的分子量。按照出峰时间的先后, 大分子量的成分较先洗脱, 因此, 推测这 4 个峰主要成分依次是 Factor Xa 酶、MBP、目的蛋白和酶切体系中的小分子化合物 (图 7)。

我们收集其中的第 3 个峰进一步纯化。经过冻干浓缩, 然后利用融合伴侣和目的小肽它们在疏水性上的差异, 进行反相高效液相色谱的分离, 从而达到制备高纯度目的小肽的目的。

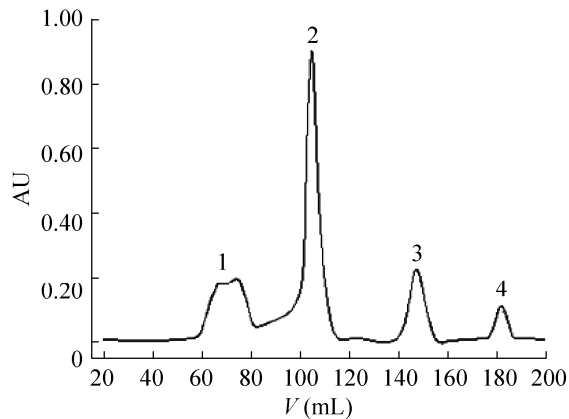


图7 凝胶过滤层析检测融合蛋白 MBP-JZTX-26 酶切
Fig. 7 Gel filtration chromatography of cleaved proteins. The chromatography was performed on Sephadex G50 column (1.6 cm×85 cm) with flow rate 0.3 mL/min. Fraction 1: protease Factor Xa and anonymous proteins; Fraction 2: MBP with a little uncleaved fusion protein; Fraction 3: purified recombinant protein JZTX-26; Fraction 4: DTT and others from cleavage buffer.

高效液相色谱层析采用了水和乙腈流动相体系,并在体系中加入0.1% TFA 作为修饰性离子对物质以增加样品的疏水性。实验结果显示,随着流动相中乙腈浓度的递增,通过检测 215 nm 处的紫外吸收值,可以得到一个明显的洗脱峰和前后一些小的杂峰(图8)。

2.6 质谱鉴定

取高效液相色谱分离后的目的蛋白峰通过质谱鉴定其分子量。结果显示,保留时间为 13.4 min 的洗脱峰中组分(JZTX-51)的分子量与目的小肽的分子量(预测 $M_w=2\ 902$)相吻合(图9),保留时间为 21.6 min 的洗脱峰中组分(JZTX-26)的分子量与目的小肽的分子量(预测 $M_w=4\ 144$)相吻合(图10)。通过进一步纯化,多肽和融合伴侣得到了较好的分离。

2.7 JZTX-51 和 JZTX-26 的活性鉴定

在全细胞模式下,检测毒素对 DRG 细胞上 TTX-S 钠离子通道和 TTX-R 钠离子通道电流-电压(I-U)曲线影响,以研究毒素对钠离子通道开

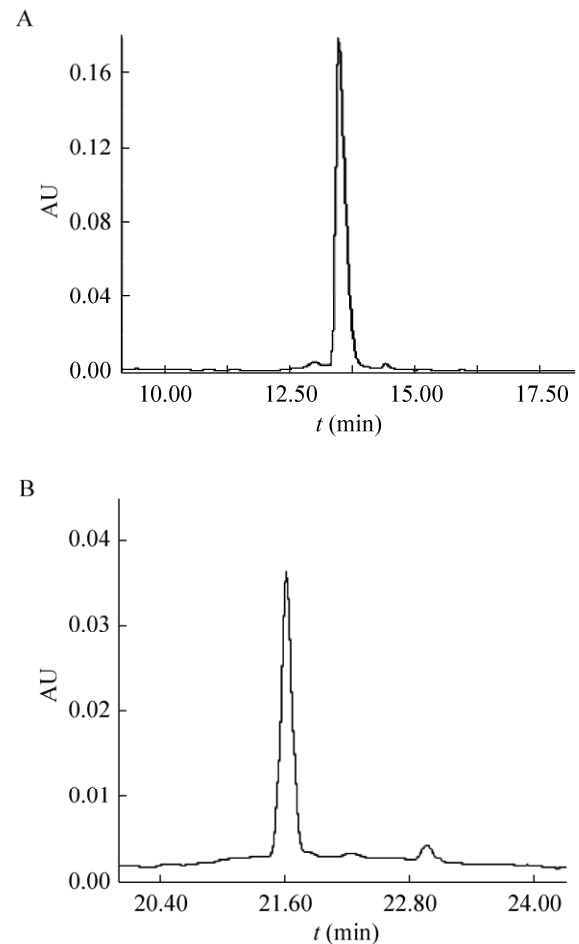


图8 HPLC 分离纯化重组 JZTX-51 (A) 和 JZTX-26 (B)
Fig. 8 Reverse Phase HPLC separation of recombinant JZTX-51(A) and JZTX-26 (B).

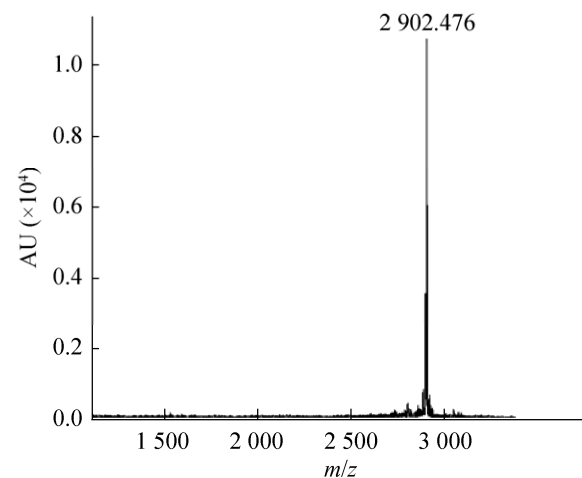


图9 JZTX-51 质谱鉴定
Fig. 9 MALDI-TOF-TOF analysis of JZTX-51.

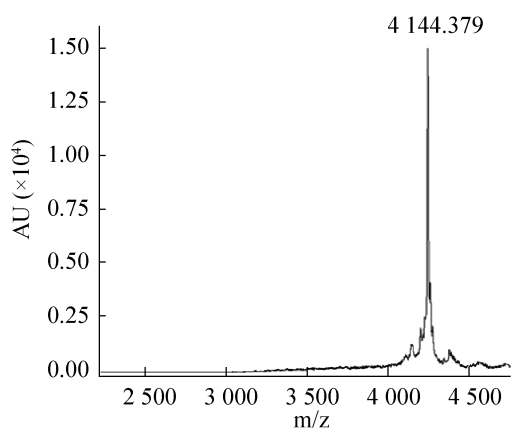


图 10 JZTX-26 质谱鉴定

Fig. 10 MALDI-TOF-TOF analysis of JZTX-26.

放的影响。细胞钳制电位 -80 mV, 测试电压变化范围 $-80 - +50$ mV, 测试电压持续时间 50 ms, 跃迁步幅 $+10$ mV。在空白对照条件下, TTX-S 钠离子通道的初始激活电压为 -40 mV, 电流最大峰值时电压为 -20 mV 左右, 逆转电位约为 $+20$ mV 左右。在细胞外液中分别加入 $10 \mu\text{mol/L}$ 重组表达的 JZTX-51、从粗毒中分离纯化的 JZTX-51^[13]或重组表达的 JZTX-26, 让毒素与细胞作用 2 min, 再以相同的去极化脉冲诱导产生电流-电压 (I-U) 曲线。结果如图 11 所示, 加入 $10 \mu\text{mol/L}$ 重组表达的 JZTX-26 后, 有 10% 的 TTX-S 钠通道电流被

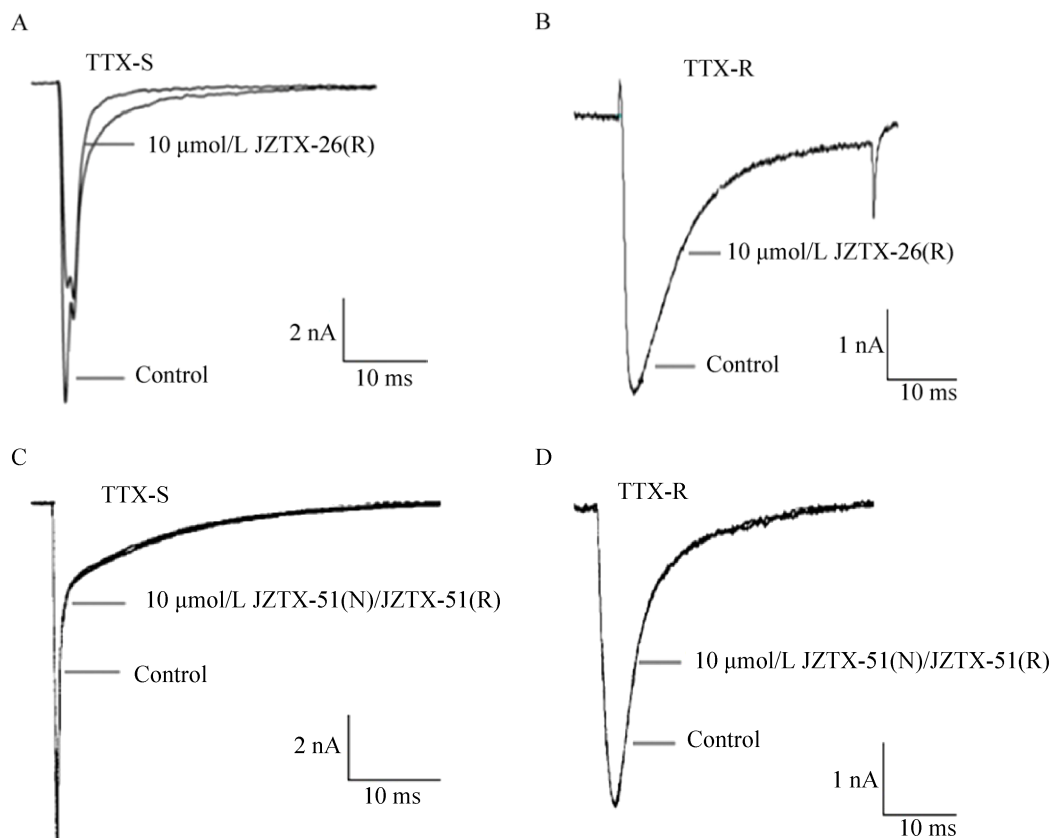


图 11 重组表达的 JZTX-26、分离纯化的 JZTX51 和重组表达的 JZTX-51 对大鼠 DRG 细胞上钠通道的作用

Fig. 11 Effects of expressed JZTX-26 (JZTX-26(R)), JZTX-51 purified from venom (JZTX-51(N)) and expressed JZTX-51 (JZTX-51(R)) on the sodium channels in rat DRG neurons. (A) Effects of JZTX-26(R) on tetrodotoxin-sensitive (TTX-S) sodium channels in rat DRG neurons. (B) Effects of JZTX-26(R) on tetrodotoxin-resistant sodium (TTX-R) channels in rat DRG neurons. (C) Effects of JZTX-51(N) and JZTX-51(R) on tetrodotoxin-sensitive (TTX-S) sodium channels in rat DRG neurons. (D) Effects of JZTX-51(N) and JZTX-51(R) on tetrodotoxin-resistant (TTX-R) sodium channels in rat DRG neurons.

抑制, 但是对 TTX-R 钠通道电流基本上无抑制作用; 加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 重组表达的 JZTX-51 和粗毒中分离纯化的 JZTX-51 对 TTX-S 钠通道和 TTX-R 钠通道的电流均无抑制作用。

3 讨论

本实验采用了以 MBP 为融合伴侣的 pMAL-p2x 融合表达系统, 它具有以下特点: 1) 采用优化的 TIR (Translation-initiation region) 和 Ptac 强启动子, 可进行稳定高效表达。2) 含大肠杆菌的分子伴侣 MBP, 其构象严紧, 热稳定性好, 当 MBP 在细胞内被过量表达时仍不被细菌蛋白酶降解, 在细胞内能协助蛋白的正确折叠, 大大提高产量。3) 加入了柔韧区, 这样在融合伴侣和外源蛋白之间提供一个过渡, 减少两者在空间结构上的相互干扰以及可能出现的刚性结构, 另外还有利于蛋白酶对融合蛋白的切割。4) 具有信号肽, 可分泌到细菌周质空间, 有利于二硫键的形成, 另外通过冷冻渗透提取蛋白可去掉绝大部分杂蛋白。5) 最大的缺点是融合蛋白必须经过酶切才能得到目的蛋白, 而酶切条件非常敏感。

针对不同的多肽, IPTG 浓度对重组表达产物会有一些影响, 一方面更高的浓度可以诱导高效的融合蛋白表达, 而有时候表达量过高容易形成包涵体, 不利于正确构型的形成; 另一方面, IPTG 对宿主菌也有一定的毒性。再者, 由于目的蛋白要形成 3 对二硫键, 因此选择较低浓度。

融合蛋白 MBP-JZTX 经酶切后, 需要将酶、融合伴侣和未切割的融合蛋白与毒素蛋白分离, 根据这些分子量和电荷性质的差异, 我们尝试了分子筛凝胶过滤层析和离子交换层析等进行纯化。但是对于小量的样品, 实验中尝试采用了超滤的方法, 取得了比较理想的结果。通过对酶切后的蛋白进行反相 HPLC 分析, 出峰单一, 表明体系中在 5 kDa 分子量以下的杂蛋白较少, 因此,

也可以通过 10 kDa 超滤膜的分离, 得到主要组分为目的小肽, 除去绝大部分的大分子杂蛋白。利用 Factor Xa 因子对融合蛋白进行酶切时, 在温度的优化中设置了 10 $^{\circ}\text{C}$ 、20 $^{\circ}\text{C}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ 3 个不同的温度梯度。实验结果表明, MBP-JZTX 在 20 $^{\circ}\text{C}$ 切割 16 h, 目的蛋白可以完全切开; 在 10 $^{\circ}\text{C}$ 下切割 16 h, 融合蛋白不能完全切开; 而在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下切割 16 h, 容易出现非特异性切割。从而确定了酶切温度为 20 $^{\circ}\text{C}$ 。

最后的纯化是采用反相高效液相色谱。在反相色谱分离中, 小肽的疏水性会大于大分子量的蛋白质, 由于差异流动相的 pH 对样品溶质的电离状态影响很大, 进而影响其疏水性, 所以在分离肽类和蛋白质等生物大分子的过程中, 通常要加入修饰性的离子对物质, 最常用的离子对试剂是 TFA (三氟乙酸), 使用浓度为 0.1%, 使流动相的 pH 值为 2-3, 这样可以有效地抑制氨基酸上 α -羧基的解离, 使其疏水性增加, 延长洗脱时间, 提高分辨率和分离效果。对于检测波长的选择, 由于 215 nm 波长主要反映蛋白质肽键的情况, 蛋白质肽键含量丰富, 因此灵敏度高, 较适用于小肽检测。280 nm 的光吸收主要反映蛋白质中含苯环的氨基酸, 相对于肽键来说, 其含量较低, 灵敏度也相对较低。于是, 实验中采用了水和乙腈流动相体系, 体系中加入 0.1% TFA 进行反相高效液相色谱的分离, 洗脱液分别通过 215 nm 和 280 nm 两种波长进行检测, 取得了较理想的分离效果。

蜘蛛活性多肽毒素只有在具有正确二硫键时才具有生物活性, 我们采用的是细菌分泌表达的方式, 这种方式表达的蛋白带有一段信号肽, 信号肽引导着蛋白穿过细胞膜进入大肠杆菌的周质空间, 信号肽随后被切除。在转运过程中, 蛋白一般要变成线性分子以穿过细胞膜, 而到了周质空间后, 蛋白在一些分子伴侣的帮助下重新再折

叠形成具有空间结构的分子, 因此, 理论上可以得到有正确结构的目标蛋白。从反相 HPLC 结果可知, 表达的融合蛋白酶切后获得的目的蛋白出峰单一, 表明目的表达产物的构象基本一致。我们采用真核系统表达 JZTX-III 时, 将表达产物与天然分离的产物进行反相 HPLC 共洗脱, 其洗脱峰能重叠, 表明构象一致^[30]。由于天然分离的这两种毒素成分都非常少, 我们未能进行进一步实验确认其构象。

大部分蜘蛛毒素作用于细胞膜上的各种离子通道或配体门控通道。DRG 细胞是脊椎动物脊髓背根内的一种假单极感觉神经元。到目前为止所发现的离子通道类型在 DRG 上几乎都有表达, DRG 上发现的通道数目不下于 20 种。实验结果显示, 分离纯化的 JZTX-51 和重组表达的 JZTX-51 对 DRG 细胞的 TTX-S 钠通道和 TTX-R 钠通道的阻断均没有明显作用, 重组表达的 JZTX-26 能抑制小部分 TTX-S 钠通道的电流, 对于 TTX-R 钠通道的电流没有抑制作用。这两种多肽毒素的作用机制还有待进一步研究。

在海洋生物毒素中, 芋螺毒素与蜘蛛毒素有很多相似之处, 如分子量小、二硫键丰富等, 并且两者都是多肽类神经毒素^[31-32], 另外, 还有河豚毒素也具有同样的特性, 并且它还具有耐高温的优点^[33]。这为蜘蛛等昆虫毒素后期的研究提供了方向。

REFERENCES

- [1] Casewell NR, Wolfgang W, Vonk FJ, et al. Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. *Trends Ecol Evol*, 2013, 28(4): 219–229.
- [2] Yan S, Wang XC. Recent advances in research on widow spider venoms and toxins. *Toxins*, 2015, 7(12): 5055–5067.
- [3] Zhang Y. Why do we study animal toxins. *Zool Res*, 2015, 36(4): 183–222.
- [4] Su P, Gong GL. Research progress on optimizing the expression of exogenous proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bull*, 2017, 33(2): 16–23 (in Chinese).
- [5] Gopal GJ, Kumar A. Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. *Protein J*, 2013, 32(6): 419–425.
- [6] Zhou P, Wagner G. Overcoming the solubility limit with solubility-enhancement tags: successful applications in biomolecular NMR studies. *J Biomol NMR*, 2010, 46(1): 23–31.
- [7] Young CL, Britton ZT, Robinson AS. Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnol J*, 2012, 7(5): 620–634.
- [8] Zhu XP, Bi JP, Yu JP, et al. Recombinant expression and characterization of α -Conotoxin LvIA in *Escherichia coli*. *Mar Drugs*, 2016, 14(1): 11.
- [9] Moon J, Gorson J, Wright M, et al. Characterization and recombinant expression of terebrid venom peptide from *terebra guttata*. *Toxins*, 2016, 8(3): 63–75.
- [10] Chen JJ, Zhao LQ, Jiang LP, et al. Transcriptome analysis revealed novel possible venom components and cellular processes of the tarantula *Chilobrachys jingzhao* venom gland. *Toxicon*, 2008, 52(7): 794–806.
- [11] Chen JJ, Deng MC, He Q, et al. Molecular diversity and evolution of cystine knot toxins of the tarantula *Chilobrachys jingzhao*. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(15): 2431–2444.
- [12] Liao Z, Cao J, Li SM, et al. Proteomic and peptidomic analysis of the venom from Chinese tarantula *Chilobrachys jingzhao*. *Proteomics*, 2007, 7(11): 1892–1907.
- [13] Yuan CH, Liu ZH, Hu WJ, et al. JZTX-XIII, a Kv channel gating modifier toxin from Chinese tarantula *Chilobrachys jingzhao*. *Toxicon*, 2012, 59(2): 265–271.
- [14] Wei P, Xu CX, Wu QQ, et al. Jingzhaotoxin-35, a novel gating-modifier toxin targeting both Nav1.5 and Kv2.1 channels. *Toxicon*, 2014, 92: 90–96.
- [15] Tao H, Wu YY, Deng MC, et al. Molecular determinants for the tarantula toxin jingzhaotoxin-I interacting with potassium channel Kv2.1. *Toxicon*, 2013, 63: 129–136.
- [16] Tao H, Chen X, Deng MC, et al. Interaction site for the inhibition of tarantula Jingzhaotoxin-XI on voltage-gated potassium channel Kv2.1. *Toxicon*, 2016,

- 124: 8–14.
- [17] Tang C, Zhou X, Huang Y, et al. The tarantula toxin jingzhaotoxin-XI (κ -theraphotoxin-Cj1a) regulates the activation and inactivation of the voltage-gated sodium channel Nav 1.5. *Toxicon*, 2014, 92: 6–13.
- [18] Deng MC, Kuang F, Sun ZH, et al. Jingzhaotoxin-IX, a novel gating modifier of both sodium and potassium channels from Chinese tarantula *Chilobrachys jingzhao*. *Neuropharmacology*, 2009, 57(2): 77–87.
- [19] Huang Y. Molecular mechanism of the tarantula toxin jingzhaotoxin-II interacting with voltage-gated sodium channel subtype Nav 1.5[D]. Changsha: Hunan Normal University, 2015 (in Chinese).
黄颖. 敬钊毒素-II 与钠通道 1.5 作用的分子机制研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2015.
- [20] Tao H, Chen JJ, Xiao YC, et al. Analysis of the interaction of tarantula toxin Jingzhaotoxin-III (β -TRTX-Cj1 α) with the voltage sensor of Kv2.1 uncovers the molecular basis for cross-activities on Kv2.1 and Nav1.5 channels. *Biochemistry*, 2013, 52(42): 7439–7448.
- [21] Zhao LQ. Eukaryotic expression and function study of toxins from the venom of the spider *Chilobrachys jingzhao*[D]. Changsha: Hunan Normal University, 2009 (in Chinese).
赵立群. 敬钊缨毛蛛多肽毒素基因的真核表达及功能研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2009.
- [22] Jiang QQ, Li HL, Liu LL, et al. The expression and purification of Jingzhao toxin in *Pichia pastoris*. *J Anhui Agric Sci*, 2014, 42(19): 6166, 6169 (in Chinese).
蒋倩倩, 李慧玲, 刘莉莉, 等. 重组敬钊毒素在毕赤酵母中的表达与纯化研究. *安徽农业科学*, 2014, 42(19): 6166, 6169.
- [23] Bao SH. Heterologous expression and electrophysiological activity research of *Chilobrachys jingzhao* spider toxins[D]. Changsha: National University of Defense Technology, 2014 (in Chinese).
鲍邵衡. 敬钊缨毛蛛毒素的异源表达及其电生理活性研究[D]. 长沙: 国防科学技术大学, 2014.
- [24] Chen JJ, Zhang YQ, Rong MQ, et al. Expression and characterization of jingzhaotoxin-34, a novel neurotoxin from the venom of the tarantula *Chilobrachys jingzhao*. *Peptides*, 2009, 30(6): 1042–1048.
- [25] Wang S, Shen MQ, Xu Y, et al. Rational and efficient preparation of a chimeric protein containing a tandem dimer of thrombopoietin mimetic peptide fused to human growth hormone in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(7): 2885–2894.
- [26] Liu XN, Zhang L, Zhang XT, et al. Molecular cloning and recombinant expression of cytochrome P450 *CYP6B6* from *Helicoverpa armigera* in *Escherichia coli*. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(2): 1211–1217.
- [27] Liu H, Li CQ, Ling BD, et al. Expression, purification and identification of LBD domain of human PPAR δ in *E. coli*. *J Med Colleges PLA*, 2009, 24(2): 76–83.
- [28] Qian YR, Sheng LX, Yao YT, et al. Structures and homology modeling of chicken major histocompatibility complex protein class I (BF2 and β 2m). *Mol Immunol*, 2005, 43(7): 1040–1046.
- [29] Gao FS, Bai J, Zhang Q, et al. Construction of multiple recombinant SLA-I proteins by linking heavy chains and light chains *in vitro* and analyzing their secondary and 3-dimensional structures. *Gene*, 2012, 502(2): 147–153.
- [30] Rong MQ, Chen JJ, Tao H, et al. Molecular basis of the tarantula toxin jingzhaotoxin-III (β -TRTX-Cj1 α) interacting with voltage sensors in sodium channel subtype Nav1.5. *FASEB J*, 2011, 25(9): 3177–3185.
- [31] Gao BM. Studies on recombinant expression of novel conotoxin gene[D]. Haikou: Hainan University, 2012 (in Chinese).
高炳森. 芋螺毒素基因重组表达研究[D]. 海口: 海南大学, 2012.
- [32] Kapon CA, Thapa P, Cabalteja CC, et al. Conotoxin truncation as a post-translational modification to increase the pharmacological diversity within the milked venom of *Conus magus*. *Toxicon*, 2013, 70: 170–178.
- [33] Deng YJ. Study on tetrodotoxin and insecticidal metabolites from two marine microbes[D]. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University, 2008 (in Chinese).
邓焱杰. 海洋微生物源河豚毒素和杀虫活性物质的研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2008.

(本文责编 陈宏宇)