

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.07.002

不同标签辅助的 IBTX 原核表达纯化及活性鉴定 *

赵志文 张 峥 刘浩文 黄智刚 吴 颖[△]

(华中科技大学生命科学与技术学院 湖北 武汉 430074)

摘要 目的:在原核体系中建立高效表达纯化 IBTX(Iberitoxin)的工艺,并比较不同标签对 IBTX 生物活性的影响。**方法:**利用引物搭桥的方法,经 PCR 扩增,获得 IBTX 编码基因,以此为模板分别构建了表达质粒 PET32a(+)-IBTX、pGex-6p-1-IBTX、pDuet-MBP-IBTX,并将其转入 *E.coli* (BL21) 分别表达带有硫氧还原蛋白(TRX)、谷胱甘肽巯基转移酶(GST)、麦芽糖结合蛋白(MBP)标签的 IBTX 融合蛋白,在经过亲和层析、烟草蚀纹病毒(TEV)蛋白酶酶切、C18 反向层析纯化后真空冻干得到 IBTX 干粉,以电生理实验检测其生物活性。**结果:**在三种标签帮助下通过原核体系表达出的 IBTX 都能够特异性的阻断大电导 Ca^{2+} 激活的钾通道(BK)电流,其中 MBP 帮助折叠的 m-IBTX 活性最佳。**结论:**建立了 IBTX 在 MBP 标签帮助下的原核表达纯化工艺,为进一步研究蝎钾离子通道 α 家族神经毒素及其突变体的原核表达奠定了基础。

关键词:钾离子通道毒素;IBTX;标签蛋白;BK

中图分类号:Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)07-1207-05

The Expression, Purification and Identification of IBTX in *E.coli* with Different Tags*ZHAO Zhi-wen, ZHANG Zheng, LIU Hao-wen, HUANG Zhi-gang, WU Ying[△]

(Huazhong University of Science and Technology, College of life science and technology, Wuhan, Hubei, 430074, China)

ABSTRACT Objective: To establish the process of expressing and purifying the effective IBTX in *E.coli*, and compare the impact of different protein tags on the bioactivity of the recombinant IBTX. **Methods:** The overlapping polymerase chain reaction (PCR) was used, and the IBTX coding sequence was cloned into PET32a (+), pGex-6p-1 and pDuet-MBP vectors. The plasmid PET32a(+)-IBTX, pGex-6p-1-IBTX and pDuet-MBP-IBTX were transformed into *E.coli* BL21 for the expression of IBTX fusion proteins. After the process of affinity chromatography, protein cleavage by TEV and reversed phase chromatography by a semi-preparative C18 column, the IBTX was lyophilized into powder and tested by the electrophysiological experiments. **Results:** All the IBTXs folded with the existence of the three tags in *E.coli* could specially block the BK channel, and the IBTX folded by MBP (m-IBTX) showed the greatest activity. **Conclusion:** The process of IBTX expression and purification with the help of MBP in *E.coli* has been well established, which provides a reference for the further research about getting the α -KTx family members and their variants in prokaryotic system.

Key words: KTX; IBTX; Protein tags; BK

Chinese Library Classification(CLC): Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)07-1207-05

前言

毒素 α -KTx 1.3(IBTX)是一种蝎钾离子通道 α 家族神经毒素,其序列包括 37 个氨基酸,与北非蝎毒素(ChTX)有 68 % 同源性,可特异性阻断 BK 通道,具有高阻断效率、高特异性等特点,在细胞电生理中广泛应用于 BK 通道功能与结构特性研究^[1-4]。目前有研究指出 BK 通道的 $\beta 4$ 亚基可使 BK 通道明显增加对 IBTX 的毒素抗性^[5,6],而 $m\beta 3$ 亚基上的 C152 靠近 BK 通道 α 亚基的 K296,是妨碍 IBTX 的阻断的关键位点^[7]。此外,IBTX 对平滑肌细胞的调节作用近年来也得到深入研究^[8,9]。

工业上生产的 IBTX 价格极为昂贵,且无法满足研究中改

变其特定位点氨基酸得到突变体多肽的需要。而 IBTX 序列含有三对二硫键^[10],难于在原核生物中直接表达得到有功能的多肽。近年来很多结构复杂的重组蛋白在具有助折叠功能的蛋白标签,如 MBP、GST、TRX,帮助下才能正确折叠^[11-13]。本文拟在原核体系中建立高效表达纯化 IBTX(Iberitoxin)的工艺,并比较不同标签对 IBTX 生物活性的影响。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株与细胞

原核表达载体 PET32a (+)、pGex-6p-1、pDuet-MBP 及真核表达质粒 PcDNA3.1-mSlo1 和菌株 *E.coli* (DH5 α)、*E.coli*

* 基金项目:国家重点基础发展规划项目(973 子项目)(2010CB529804)

作者简介:赵志文(1986-),男,博士研究生,主要研究方向:重组蛋白的表达纯化与结晶,

电话:15172469742, E-mail: zzw860823@126.com

[△] 通讯作者:吴颖,电话:15607160030, E-mail: wuying2010@hust.edu.cn

(收稿日期:2013-06-28 接受日期:2013-07-19)

(BL21)、HEK293 细胞均由本实验室保存。

1.2 酶与试剂

MscI、*NotI*、*EcoRI*、*XhoI*、*Pfu* 酶、T4 连接酶均购自 NEB 公司。PCR purification kit、Gel extraction kit 和 Plasmid miniprep kit 购自天根公司。TEV 蛋白切割酶、IPTG 等酶及生化试剂均为国产或进口分析纯。

1.3 IBTX 基因的 PCR 扩增

根据已报道的 IBTX 氨基酸序列 (Genbank 查询号:

P24663) 以及大肠杆菌的偏爱密码子设计 IBTX 拼接引物 IB-1、IB-2、IB-3(表 1),用引物搭桥的方法进行 PCR 扩增。在后续实验中因需用到 TEV 蛋白酶酶切,故在序列 5' 端引入编码 TEV 酶切位点序列 (ENLYFQG)。将搭桥引物 IB-1、IB-2、IB-3 加入 PCR 体系,条件:95 ℃ 预变性 3 min,94 ℃ 变性 30 s,50 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,反应 30 个循环后,72 ℃ 后延伸 10 min。

表 1 根据 IBTX 氨基酸序列设计的扩增引物

Table 1 The primers designed by the aminoacid sequence of IBTX

Primer name	Primer sequence (5'--3')
IB-1	ATGGAGAACTTGTACTTCCAGGGTCAGTTTACCGATGTGGATTGCAGCGT
IB-2	GTGGATTGCAGCGTGAGCAAGGAATGCTGGAGCGTGTGCAAAGATCTGTTGGCGTGGA
IB-3	CTACTGATAGCAGCGGCACTTCTTGCCCATGCATTGCCGCGATCCACGCCAAACAG
IB-EcorI-up	ATCGAATTCATGGAGAACTTGTACTTCCA
IB-XhoI-low	ATCCTCGAGCTACTGATAGCAGCGGCACT
IB-MscI-up	ATCTGGCCAATGGAGAACTTGTACTTCCA
IB-NotI-low	ATCGCGGCCGCTACTGATAGCAGCGGCACT

1.4 表达质粒的构建

1.4.1 PET32a-IBTX 的构建 以扩增得到的 IBTX 为模板,以引物 IB-MscI-up、IB-XhoI-low(表 1)再次扩增,得到的 DNA 片段与 PET32a(+)以 *MscI* 和 *XhoI* 内切酶处理,回收后以 1:3 比例混合后 T4 DNA 连接酶 16 ℃ 连接过夜,并转化 *E.coli*(DH5 α),挑选阳性菌落提取质粒送武汉诺赛公司测序鉴定。

1.4.2 pGex-6p-1-IBTX 的构建 方法如 1.4.1 所述,扩增引物分别为 IB-EcorI-up、IB-XhoI-low(表 1),载体为 pGex-6p-1,内切酶为 *EcorI* 和 *XhoI*。

1.4.3 pDUET-MBP-IBTX 的构建 方法如 1.4.1 所述,扩增引物分别为 IB-EcorI-up、IB-NotI-low(表 1),载体为 pDuet-MBP,内切酶用 *EcorI* 和 *NotI*。

1.5 IBTX 的表达与纯化

测序正确的 IBTX 表达质粒转入 *E.coli*(BL21)并挑取单菌落,接入 5 mL LB 培养基,37 ℃ 转速 200 rpm 培养过夜;将 5 mL 新鲜培养基接入 1 L 的 LB 培养基,37 ℃ 转速 200 rpm 进行培养,当 OD600 达到 0.6-0.8 时,加入终浓度为 0.2 mM 的 IPTG,30 ℃ 诱导 5 h,4500 rpm 15 min 收集菌体,并重悬于 40 mL 裂解液 (mM):150 NaCl,20 Trise,20% 甘油,pH 7.5。冰上 400 W 功率超声破菌 10 min(5 s 开,5 s 关),10000 rpm 离心 60 min 收集上清。对于 PET32a(+)-IBTX 与 pDuet-MBP-IBTX,取上清液过镍柱亲和层析,浓缩洗脱后的融合蛋白至 2 mL,加入 TEV 蛋白切割酶(分子比 250:1)室温酶切过夜。酶切液经过滤后过 HPLC 半制备的 C18 反相柱,洗脱程序为:10 % 乙腈 10 min,10 %-80 % 乙腈 35 min,80 % 乙腈 10 min,流速 2 mL/min,监视波长 280 nm。收集洗脱得到的 IBTX 蛋白峰冻干成干粉,并以纯水重悬后用 BCA 法定量。pGex-6p-1-IBTX 表达的融合蛋白带有 GST 标签,以 GST 亲和层析柱进行纯化,其余步骤

与上述相同。

1.6 电生理活性检测

将得到的三种 IBTX 干粉溶解于细胞外液配成所需浓度。在转染了 PcDNA3.1-mSlo1 的 HEK293 细胞上用内膜向外的膜片钳记录模式记录 BK 通道电流。细胞钳制在 0 mV,以 200 ms、+90 mV 的去极化脉冲刺激,然后给予 50 ms、-120 mV 超极化刺激,观察尾电流情况。通过灌注系统精确加入配好的 IBTX 毒素及作为对照的钾通道阻断剂四乙铵(TEA),记录电流变化(具体方法可参见^[26])。

2 结果

2.1 IBTX 的 PCR 扩增及其表达质粒构建

IB-1、IB-2、IB-3 引物搭桥 PCR 扩增的产物用琼脂糖凝胶电泳鉴定在 200 bp 附近有十分明显的 DNA 扩增带,与预期基因大小一致(图 1A)。以其为模板,分别用相应引物再次扩增,所得 PCR 产物经双酶切后连接到相应载体,经测序得到序列正确的 PET32a(+)-IBTX、pGex-6p-1-IBTX、pDuet-MBP-IBTX。表达框架见图 1C。

2.2 重组菌表达纯化分析

1 L 重组菌经 IPTG 于 30 ℃ 诱导表达 5 h 后,收集菌体,2 $\times$ SDS 裂解液裂解,SDS-PAGE 鉴定表达产物。结果表明,融合蛋白 TRX-IBTX (17KD)、GST-IBTX (31KD) 和 MBP-IBTX (44KD)在 BL21 中都大量表达,其中 MBP-IBTX 表达量较高,约占总蛋白含量的 50 % (图 2A)。MBP-IBTX 融合蛋白经过 Ni-NTA 亲和层析纯度达到 85 % 以上,浓缩后 TEV 酶切过夜,有 90 % 以上重组蛋白被切开。过 HPLC C18 反相柱,在乙腈浓度 25 % 左右出现 m-IBTX 吸收峰,经 SDS-Page 凝胶电泳鉴定 m-IBTX 大小与预测分子量吻合,纯度在 90 % 以上(图 2B、C)。

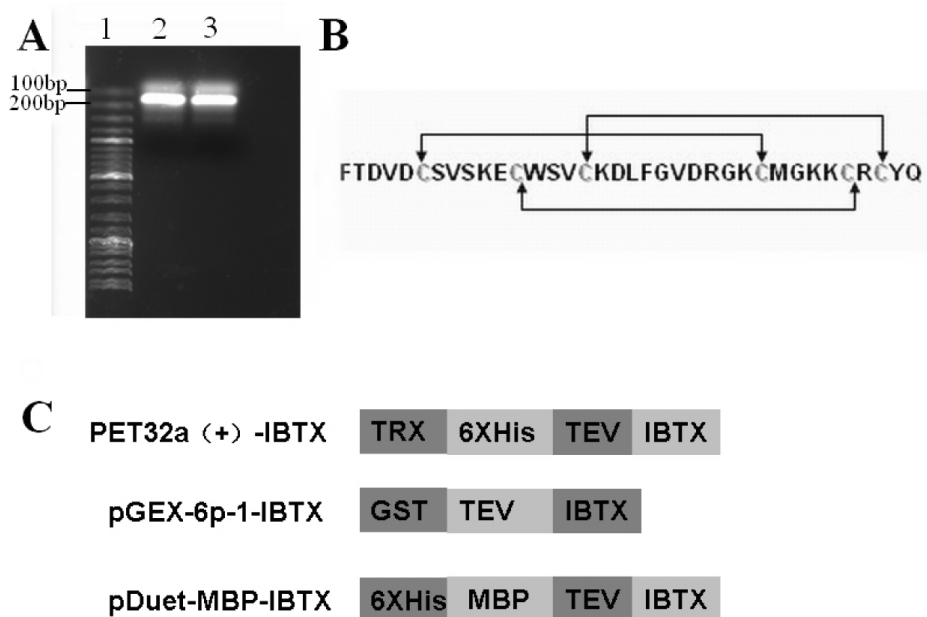


图1 IBTX 表达质粒的构建

(A) IBTX 编码基因的扩增。1 DNA ladder 2、3 IBTX 编码基因 PCR 结果。(B) IBTX 的氨基酸序列及二硫键配对。

(C) 表达质粒的融合蛋白框架

Fig.1 The construction of IBTX expression plasmid

(A) Amplification of IBTX coding sequence. 1 DNA marker 2,3 IBTX PCR results. (B) The amino acid sequence of IBTX and the disulfide bond pairing of the 6 cysteines. (C) The construction of IBTX fusion proteins

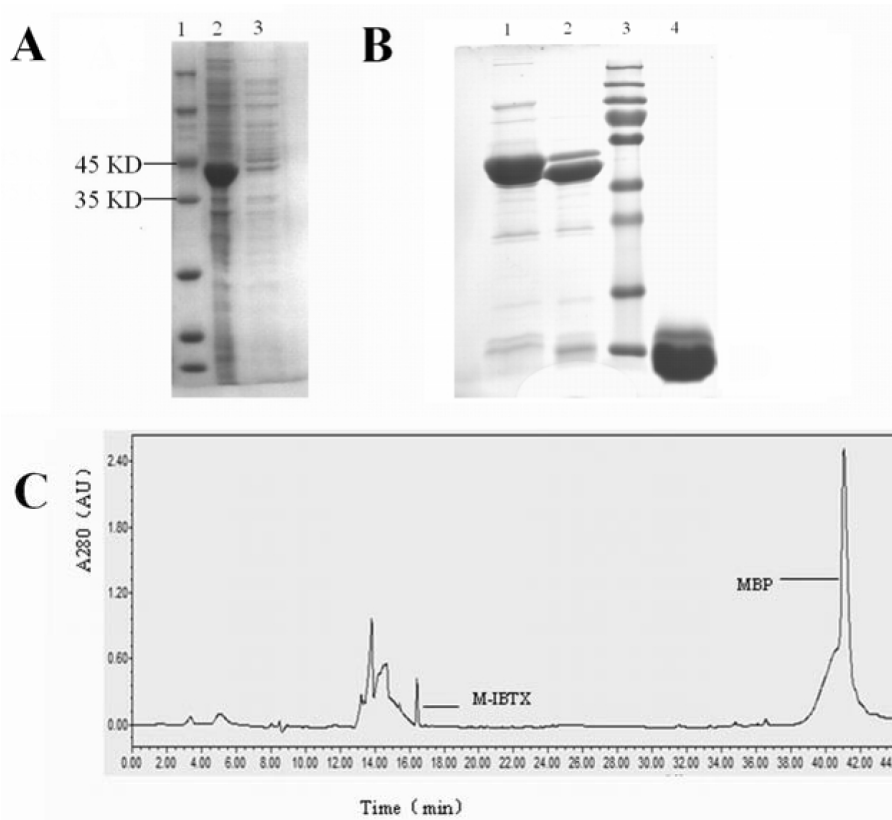


图2 m-IBTX 的表达纯化情况

(A) 融合蛋白 MBP-IBTX 的表达情况。1 蛋白 marker 2 诱导后 3 诱导前 (B) m-IBTX 的纯化情况。1 经 Ni 柱亲和层析的 MBP-IBTX 2 TEV 蛋白酶切 3 蛋白 marker 4 经反相层析纯化后的 m-IBTX (C) m-IBTX 反相层析纯化情况

Fig.2 The analysis of the m-IBTX expression and purification

(A) The expression of fusion protein MBP-IBTX 1 protein marker 2 after induced 3 before induced (B) The purification of m-IBTX. 1 MBP-IBTX purified by Ni affinity chromatography 2 protein cleaved by TEV protease 3 protein marker 4 the concentrated m-IBTX purified by a C18 reverse chromatography (C) Reversed-phase C18 chromatography of m-IBTX

TRX 及 GST 标签帮助折叠的 IBTX(t-IBTX、g-IBTX)纯化结果与 m-IBTX 类似。冻干后的 IBTX 干粉加水溶解,BCA 法定量,其中 m-IBTX 得率约为 0.25 mg/L,g-IBTX 得率约为 0.15 mg/L,t-IBTX 得率约为 0.5 mg/L。

2.3 IBTX 的活性鉴定及比较

三种重组 IBTX 都具有生物活性,能有效抑制 BK 通道电流。其中 1 μ M g-IBTX 只能阻断约 50 % BK 电流,1 μ M t-IBTX 可阻断 80 % 的电流而 m-IBTX 抑制作用最强,可在 1 μ M 浓度下完全阻断 BK 电流(图 3)。

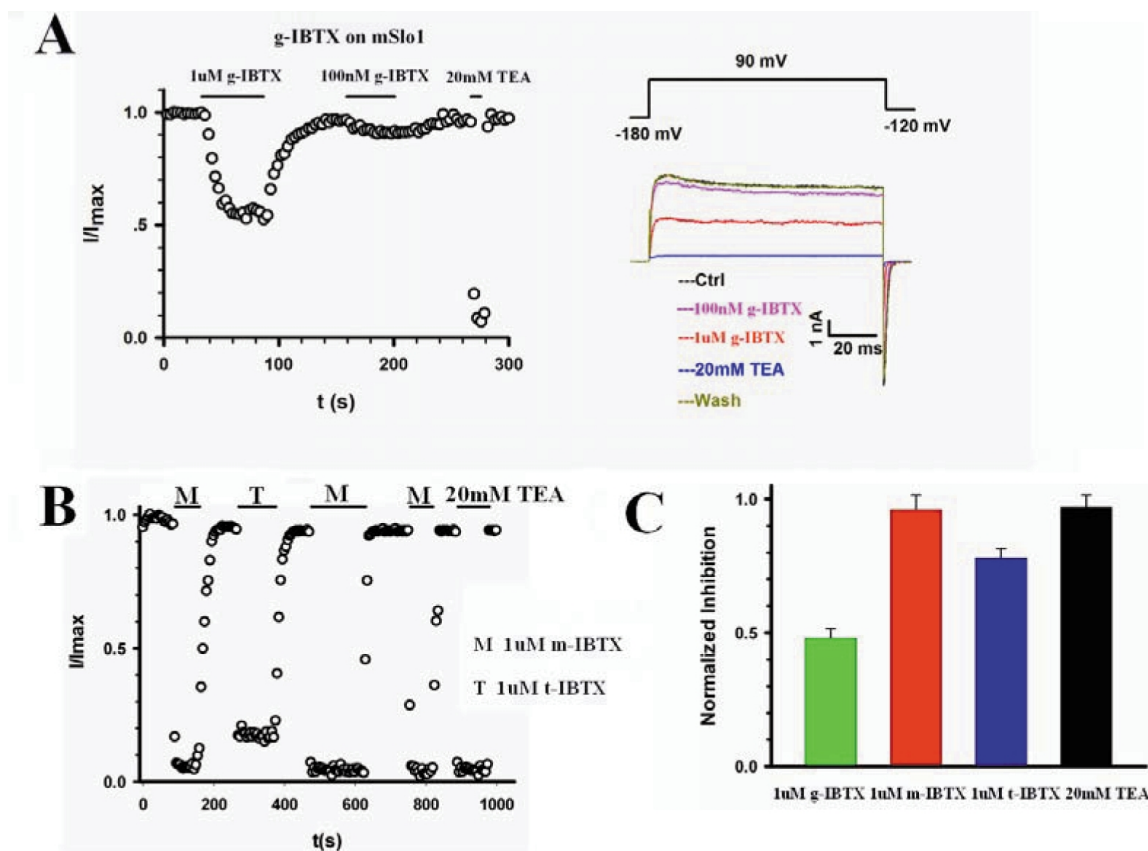


图 3 g-IBTX、m-IBTX 及 t-IBTX 对 BK 通道电流的阻断情况

(A) g-IBTX 的药效检验。左半部分是为实时电流与电流峰值比值随时间的作图,加药与洗脱的时间如图所示。右半部分 mSlo1 的电流 Traces,所用电压 protocol 如图所示。(B) m-IBTX、t-IBTX 的药效检验。(C) g-IBTX、m-IBTX、t-IBTX 的归一化的阻断效果

Fig.3 The function of g-IBTX, m-IBTX and t-IBTX on mSlo1

(A)The function of g-IBTX. Left: the ratio of I/I_{max} plotted as a function of time. The time of adding and washing drugs has been pointed out. Right: the current traces of mSlo1. The voltage protocol is plotted at the top of each trace. (B) The function of m-IBTX and t-IBTX. (C) The normalized inhibition of each IBTX

3 讨论

蝎毒液中含有丰富的毒素多肽,20 多年来已鉴定出超过 120 多个蝎钾离子通道抑制多肽^[14]。这其中蝎钾离子通道 α 家族神经毒素是最大的亚族,其序列一般在 23 到 39 个氨基酸,含有 3 到 4 对二硫键,是探索离子通道绝好的分子探针工具,广泛应用于研究各种钾离子通道的组织分布、组成和结构、生理药理学特性^[15,16]。蝎钾离子通道毒素也是靶向离子通道药物开发极为宝贵的模板。目前主要有三种方法获得蝎毒素多肽:1 直接从蝎毒液中提纯。这种方法所得毒素结构功能特性最好,但分离纯化复杂,蝎毒液获取困难,成本极高。2 通过化学合成的方法,但难以保证合成毒素的二硫键是否正确配对。3 重组表达毒素多肽。目前该方法已成为获取蝎毒素多肽的首选方法^[17,18]。

本文根据已报道的 IBTX 序列以及大肠杆菌的偏爱密码

子设计拼接引物,用引物搭桥的方法成功扩增 IBTX 编码基因,并将其在原核体系中分别与三种常见标签蛋白融合表达,经一系列纯化手段后成功得到有功能的 IBTX 毒素,并对比了不同标签帮助 IBTX 正确折叠的能力。结果表明在 MBP 标签作用下,原核表达的 m-IBTX 相较于在 TRX、GST 标签帮助折叠的 t-IBTX、g-IBTX,具有较高活性,MBP 标签对于这一类毒素的助折叠功能可能优于 TRX 及 GST。这项研究对于以 IBTX 为基础的靶向 BK 通道多肽药物的设计具有重要意义,同时也为其他蝎钾离子通道 α 家族毒素在原核中的高效表达的研究奠定了基础。

但相较天然毒素,所得重组 IBTX 效率偏低,洗脱时间较快,说明其与 BK 通道的结合方式与天然 IBTX 相较仍存在一定差异。其原因可能是原核表达体系有限的翻译后修饰能力造成 IBTX 未能完全正确折叠。在今后的研究中,应该进一步研究如何结合化学手段如氨基酸的环化、酰基化等对产物进行修

饰,摸索出效率能与天然 IBTX 相媲美的表达纯化工艺。

参考文献(References)

- [1] Galvez A, Gimenez-Gallego G, Reuben JP, et al. Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265(19): 11083-11090
- [2] Tang QY, Zhang Z, Xia XM, et al. Block of mouse Slo1 and Slo3 K⁺ channels by CTX, IbTX, TEA, 4-AP and quinidine[J]. *Channels*, 2010, 4(1): 22-41
- [3] Gomase VS, Phadnis AC, Somnath W. Proteomics based prediction of antigenicity of iberiotoxin from eastern Indian scorpion[J]. *International Journal of Drug Discovery*, 2009, 1(1): 10-13
- [4] Haghdoust-Yazdi H, Janahmadi M, Behzadi G. Iberiotoxin-sensitive large conductance Ca²⁺-dependent K⁺ (BK) channels regulate the spike configuration in the burst firing of cerebellar Purkinje neurons[J]. *Brain research*, 2008, 1212: 1-8
- [5] Meera P, Wallner M, Toro L. A neuronal β subunit (KCNMB4) makes the large conductance, voltage-and Ca²⁺-activated K⁺ channel resistant to charybdotoxin and iberiotoxin [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97(10): 5562-5567
- [6] Gan G, Yi H, Chen M, et al. Structural basis for toxin resistance of β 4-associated calcium-activated potassium (BK) channels[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(35): 24177-24184
- [7] Wu RS, Liu G, Zakharov SI, et al. Positions of β 2 and β 3 subunits in the large-conductance calcium-and voltage-activated BK potassium channel[J]. *The Journal of general physiology*, 2013, 141(1): 105-117
- [8] Rice A. Regulation of smooth muscle activity in the rat: Effects of castration and iberiotoxin[D]. *Youngstown State University*, 2011
- [9] Upadhyay DK, Kim TW, Sharma N, et al. Magnesium increases iberiotoxin-sensitive large conductance calcium activated potassium currents on the basilar artery smooth muscle cells in rabbits [J]. *Neurological Research*, 2012, 34(1): 11-16
- [10] Johnson BA, Sugg EE. Determination of the three-dimensional structure of iberiotoxin in solution by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. *Biochemistry*, 1992, 31(35): 8151-8159
- [11] Banères JL, Popot JL, Mouillac B. New advances in production and functional folding of G-protein-coupled receptors[J]. *Trends in biotechnology*, 2011, 29(7): 314-322
- [12] Vincentelli R, Cimino A, Geerlof A, et al. High-throughput protein expression screening and purification in *Escherichia coli*[J]. *Methods*, 2011, 55(1): 65-72
- [13] Hayashi K, Kojima C. Efficient protein production method for NMR using soluble protein tags with cold shock expression vector[J]. *Journal of biomolecular NMR*, 2010, 48(3): 147-155
- [14] Martin-Eauclaire MF, Bougis PE. Potassium Channels Blockers from the Venom of *Androctonus mauretanicus mauretanicus*[J]. *Journal of toxicology*, 2012, 2012: 103608-103608
- [15] 吴英亮,曹志贱,蒋达和,等.作用于钾离子通道蝎毒素的结构特征及活性表面研究进展 [J]. *生物物理学报*, 2004, 20(2): 96-101
Wu Ying-liang, Cao Zhi-jian, Jiang Da-he, et al. Structural characteristics and development of bioactive surface research of scorpion toxins affecting potassium ion channels[J]. *Acta Biophysica Sinica*, 2004, 20(2): 96-101
- [16] Garcia ML, Hanner M, Knaus HG, et al. Scorpion toxins as tools for studying potassium channels[J]. *Methods in enzymology*, 1999, 294: 624-639
- [17] Quintero-Hernandez V, Ortiz E, Rendon-Anaya M, et al. Scorpion and spider venom peptides: gene cloning and peptide expression[J]. *Toxicon*, 2011, 58(8): 644-663
- [18] Bingham JP, Chun JB, Ruzicka MR, et al. Synthesis of an iberiotoxin derivative by chemical ligation: A method for improved yields of cysteine-rich scorpion toxin peptides[J]. *Peptides*, 2009, 30(6): 1049-1057
- [15] Prassopoulos, Raptopoulos V, Chuttani R. Development of virtual CT cholangiopancreatography[J]. *Radiology*, 1998, 209(2): 570-574
- [16] Lee DH. Three-dimensional imaging of the stomach by spiral CT[J]. *J Comput Assist Tomogr*, 1998, 22(1): 52-58
- [17] Iriuchishima T, Horaquchi T, Kubomura T. Evaluation of the intercondylar roof impingement after anatomical double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction using 3D-CT [J]. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2011, 19(4): 674-679
- [18] Hoshino Y, Kim D, Fu FH. Three-dimensional anatomic evaluation of the anterior cruciate ligament for planning reconstruction[J]. *Anat Res Int*, 2012, 2012: 569-704
- [19] Rispoli DM, Sanders TG, Miller MD. Magnetic resonance imaging at different time periods following hamstring harvest for anterior cruciate ligament reconstruction[J]. *Arthroscopy*, 2001, 17(1): 2-8
- [20] 孙丛,柳澄,王锡明,等. 双能 CT 成像在显示膝关节韧带中的价值 [J]. *中国医学影像技术*, 2008, 24(9): 1323-1325
Sun Cong, Liu Cheng, Wang Xi-ming, et al. Value of dual-energy CT imaging in displaying ligaments of knee [J]. *Chinese Journal of Medical Imaging Technology*, 2008, 24(9): 1323-1325

(上接第 1278 页)