

蛇神经毒素在毕赤酵母中的分泌表达及其分离纯化

张 伟 陈劲春 *

(北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029)

摘 要: 文中主要研究了毕赤酵母基因工程菌的构建及其发酵表达产物蛇神经毒素的分离纯化条件。蛇神经毒素编码基因由本实验室设计、合成,并重组构建表达质粒 pPIC9k-hPK。经电穿孔将该质粒转化毕赤酵母 GS115 (His⁻Mut⁺),筛选 His⁺Mut^s 型菌株,经诱导表达,产物进行 SDS-PAGE 电泳鉴定,相对分子质量与理论值一致,目标蛋白经小试发酵产量可达 350 mg/L。利用超滤、离子交换树脂及分子筛分离纯化,产物经高效液相色谱(HPLC)分析纯度达 92%。

关键词: 毕赤酵母;分离纯化;神经毒素

中图分类号: Q786

蛇神经毒素(SN)是一类具有与神经肌肉接头 N-型乙酰胆碱(*n*ACHR)受体结合活性的小分子蛋白质^[1]。它与 *n*ACHR 结合后,阻碍化学神经递质乙酰胆碱与受体的结合,阻断了肌肉兴奋,导致弛缓性麻痹。因此,神经毒素可以用来研究 *n*ACHR 结构、功能及其相互关系以及研究神经传导和离子通道等极好的工具^[2],同时神经毒素也具有较高的医用价值,如治疗重症肌无力,并且有良好的镇痛、戒毒、抑瘤作用等。传统工艺是从蛇毒中提取,近年来有人利用大肠杆菌为载体进行表达^[3],前者资源有限,后者由于胞内表达量不高,同时产物为融合蛋白需要破碎细胞,受收率限制进一步降低了产量,最高只能达到 100 mg/L。本文选用适合外源蛋白分泌表达的巴斯德毕赤酵母为表达宿主,甲醇诱导型(醇氧化酶基因 AOX1)启动子作为上游调控元件,可通过甲醇严格控制蛋白表达,产物直接分泌到胞外,提高了收率,经小试产量达 350 mg/L。

1 材料和仪器

1.1 材料

P. pastoris GS115 和 pPIC9 K 购自 Invitrogen 公司;目的基因由本实验室设计并构建表达载体;限制性内切酶 Bgl 购自 Takara 公司;氨苄青霉素

(AMP)和抗生素 G418 购自华美公司;标准品均购于 Sigma 公司;乙腈为色谱纯,其它试剂均购自北京试剂公司。

大肠杆菌培养基 2 ×YT(质量分数)(1.6%蛋白胨+1%酵母粉+1%NaCl,pH 值 7.0);酵母培养基 YPD(1%酵母粉+2%蛋白胨+2%葡萄糖);酵母培养基 YPG(质量分数)(1%酵母粉+2%蛋白胨+3%甘油);筛选平板 MM 组分(质量分数)(1.34%YNB+1%葡萄糖+生物素+1.5%琼脂粉),MD(1.34%YNB+0.5%甲醇+生物素+1.5%琼脂粉)。

基础盐培养基 BSM 组成(g/L) 硫酸钙 0.93,硫酸钾 18.2,七水硫酸镁 14.9,甘油 40,硫酸铵 10,0.1 mol/L 的 pH6.0 磷酸钾缓冲液。PTM₁ 微量元素(g/L) 五水硫酸铜 6.0,碘化钠 0.08,一水硫酸锰 3.0,二水钼酸钠 0.2,硼酸 0.02,氯化钴 0.5,氯化锌 20.0,七水硫酸亚铁 65.0,生物素 0.2,硫酸 9.2^[4]。培养基试剂均为进口分析纯及生化试剂。

1.2 仪器

DYY-5 型稳压稳流电泳仪 北京六一仪器厂;WFB-UV-2000 型紫外可见分光光度计 龙尼柯(上海)仪器有限公司;GUJS-10. AUTOBIO 全自动发酵罐 镇江东方生物设备有限公司;高效液相色谱岛津 10A 日本岛津公司。

2 实验部分

2.1 质粒的提取、电转化及转化子的筛选

将 *E. coli* 接种在含有 AMP 的培养基 2 ×YT 中,37 °C 培养过夜,5 000 r/min ×5 min 离心收集菌

收稿日期: 2004-12-31

第一作者: 男,1979 年生,硕士生

*通讯联系人

E-mail: zhangwei @grad. buct. edu. cn

体,按有机溶剂法提取质粒^[5]。取适量质粒和限制性内切酶Bgl 混匀,37 酶切2 h,再用0.7%琼脂糖凝胶电泳鉴定。将已线性化的质粒和感受态GS115按Invitrogen进行电转化^[6]。将电转化后在MD平板上生长的His⁺克隆同时点接在MM,MD平板上,30 培养3~6 d,观察MD平板上生长明显快于MM平板的即为His⁺ Mut^s转化子。由于pPIC9K含有一个卡那霉素的抗性基因,其转染的宿主菌能够耐受G418,转入外源基因的拷贝数增多,宿主耐受G418的量就越高,所以再将His⁺ Mut^s转化子点接在G418的质量浓度分别为0.25,0.50,0.75,1 mg/mL的YPD平板上,30 培养一周,可筛选出耐受G418的高拷贝转化子。

2.2 培养

新鲜平板上30 生长48 h,挑取单菌落接到10 mL YPG培养基中培养过夜,以10%的接种量转接到基础盐培养基中(250 mL带挡板摇瓶),30 ,200 r/min旋转培养48 h左右加入甲醇诱导,此后每隔6 h补加一定量的甲醇,96 h停止发酵,然后利用发酵罐进行放大。取30 μ L种子液接种于5 mL YPG培养基中培养过夜(一级种子液),然后转接到50 mL YPG培养基中培养24 h(二级种子液),再分别转接到两瓶250 mL的YPG培养基中培养至吸光度 A_{600} 达到2~5,形成500 mL三级种子液,最后接种到4.5 L工业培养基中上罐培养,24 h后每天加入1%的甲醇诱导,4 d后下罐离心,留上清液。

2.3 分析检测

将提取得大肠杆菌质粒用Bgl 处理成线性化后,进行琼脂糖电泳,溴化乙啶染色,紫外透射光下观察结果以鉴定线性化质粒的提取;菌液稀释后于波长600 nm处以去离子水为参比进行比色测定细胞密度;采用考马斯亮蓝染色法,发酵液离心取上清液于波长595 nm处以考马斯亮蓝为参比进行比色测定总蛋白;纯度由聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)计算机扫描分析软件检测^[7];采用高碘酸氧化法测定甘油浓度;将目标蛋白取样约0.100 g,用25 mL的乙腈溶解,吸取20 μ L样品进样,色谱柱为Alltech C₁₈ (250 \times 4.6 mm, 4.5 μ m),流动相为100%乙腈,由岛津10 A紫外检测器室温下检测目标蛋白,检测波长为327 nm,流速为1 mL/min。重组菌株经诱导培养,取适量的上清进行凝胶电泳分析。对于该小分子多肽采用Tricine-SDS-PAGE系统,16.5%的胶体,考马斯亮蓝G250染色。

3 结果与讨论

3.1 His⁺ Mut^s 转化子的筛选

GS115是组氨酸的缺陷型(HIS⁻),pPIC9质粒线性化后与感受态宿主染色体上的AOX1基因同源重组,宿主AOX1被取代,pPIC9质粒上带有HIS基因和卡那霉素抗性基因,所以转化后的阳性克隆可以在MD平板和含有G418的YPD平板上生长,在以甲醇为唯一碳源的MM上则生长缓慢(如图1),以此作为筛选标志本实验获得18个重组阳性克隆和4个高拷贝菌株。

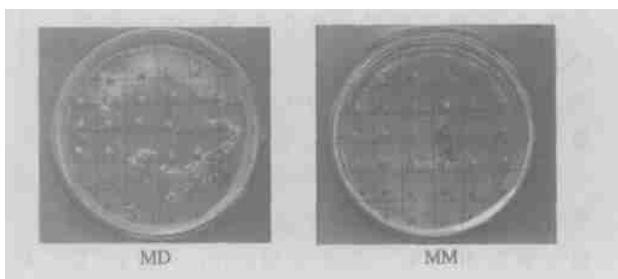


图1 重组子MD,MM平板上的对照

Fig.1 Comparison of the recombinants on MM and MD plates

3.2 菌株在基础盐培养基中的生长曲线

将菌种接种于基础盐培养基中,测定其在基础盐培养基中的生长曲线如图2所示。

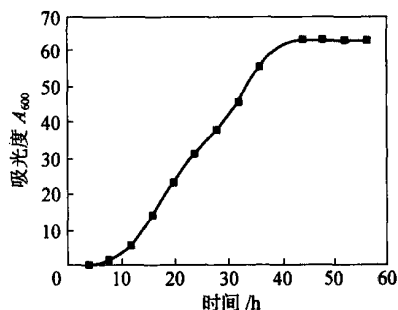


图2 毕赤酵母生长曲线

Fig.2 Growth curve of pastoris

通过对生长曲线的测定可知10 h后,酵母进入指数生长期,40 h后进入稳定生长期。

3.3 目标蛋白的凝胶电泳分析

图3为蛇神经毒素蛋白电泳图谱,目标蛋白的相对分子质量与理论设计(7800)吻合,表达量随诱导时间逐渐增大的表达模式正确。经计算机扫描分析表明,目的蛋白条带的蛋白质量分数约占75%左右。

3.4 表达产物的初步分离

发酵液经15000中空纤维超滤膜(内压式,压力



图3 神经毒素凝胶电泳分析图谱

Fig. 3 Electrophoresis analysis of SN

0.05 MPa) 去除大分子杂蛋白后上 6000 膜(外压式, 压力 0.05 MPa) 脱盐浓缩并除去小分子杂蛋白, 然后进行离子交换, 采用弱阴性 DEAE FF 阴离子交换柱, 上样缓冲液为 pH8.0 的 Tris-HCl, 梯度洗脱 (NaCl 浓度 0.1 ~ 0.5 mmol/L), 280 nm 紫外吸收监测, 结果表明 NaCl 浓度为 0.33 mmol/L 时洗脱效果最佳。洗脱液冷冻干燥浓缩后利用分子筛 G25 进一步纯化(以去离子水作为流动相)得样品。各步收率分别为: 超滤 92%; 离子交换 85%; 分子筛 85%, 总收率为 66.5%。高效液相 (HPLC) 分析纯度为 92%, 图 4 为 HPLC 分析图谱。

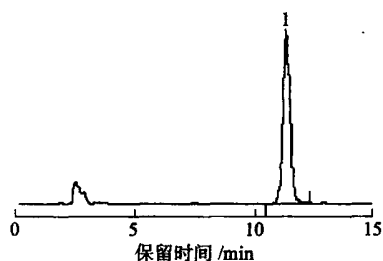


图4 目标蛋白高效液相分析图谱

Fig. 4 HPLC analysis of SN

4 讨论

蛇神经毒素传统提取方法由于蛇毒资源有限, 开发前景不大; 利用大肠杆菌作为载体又存在包涵体破碎及产物回收率低的问题。近年来, 毕赤酵母基因表达系统得到了广泛的研究, 已基本发展成为较完善的外源基因表达系统, 具有易于高密度发酵, 培养方便经济等特点, 已广泛用于外源蛋白的表达^[7]。本实验用毕赤酵母发酵得到较高的产量, 实验室小试已达到 350 mg/L, 经初步分离纯度达 90% 以上, 并且还将在提高产量和进一步分离纯化上作深入研究。

参 考 文 献

- [1] Qian Youcun. Expression and characterization of two kinds of recombinant snake neurotoxins [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2000, 5(3): 312 - 315
- [2] Endo T, Tamiya N. Structure and function relationships of postsynaptic neurotoxins from snake venoms: In snake toxins [M]. New York: Pergamon Press, 1991, 165 - 222
- [3] 蔡勤, 何志勇, 龚毅. 中华眼镜蛇短链神经毒素 cDNA 的克隆及在大肠杆菌中的表达[J]. 遗传, 1999, 21(5): 1
- [4] Anjou M C, Daugulis A J. A model-based feeding strategy for fed-batch fermentation of recombinant pichia pastoris[J]. Biotechnol Techniques, 1997(11): 865 - 868
- [5] Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. Molecular cloning a laboratory manual [M]. Beijing: Science Publishing company, 1993
- [6] Invitrogen. Pchla expression kit [M]. California: Invitrogen, 2000
- [7] 聂东宋, 梁宋平, 李敏. 外源蛋白在巴氏毕赤酵母中高效表达的策略[J]. 吉首大学学报, 2001, 22(3): 40 - 44

Separation and purification of recombinant snake neurotoxins from *Pichia pastoris*

ZHANG Wei CHEN Jin-chun

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: The conditions of fermentation for recombinant neurotoxins tranfering into P Pastoris GS 115 and their further purification procedures were investigated. An identification of the target protein was carried out with the SDS-PA GE electrophoresis and its productivity reached 350 mg/L. After the purification procedures including the ultra filtration, ion-exchange chromatography and the gel filtration were performed, the purity of the product, which was analyzed by HPLC, was 92%.

Key words: *Pichia pastoris*; separation and purification; neurotoxins

(责任编辑 云志学)