

## 重组虎纹捕鸟蛛毒素-I 在巴氏毕赤酵母中的表达及纯化

聂东宋<sup>1</sup> 李 敏<sup>1,2\*</sup> 徐辉明<sup>1</sup> 何宁佳<sup>1</sup> 梁宋平<sup>1</sup>

<sup>1</sup>( 湖南师范大学生命科学学院 长沙 410081 )

<sup>2</sup>( 福建师范大学生物工程学院 福州 350007 )

**摘 要** 虎纹捕鸟蛛毒素 I 是从虎纹捕鸟蛛粗毒中分离纯化,具有镇痛活性的肽类神经毒素。对巴氏毕赤酵母生产的重组 HWTX-I 进行多步纯化,首先将分泌到培养上清的 rHWTX-I 进行 90% 饱和度的  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  沉淀,再用截留分子量 3kD 的滤膜脱盐,再用 CM 阳离子交换层析分离,最后用  $\text{C}_{18}$  反相层析脱盐纯化,真空干燥后得到的 rHWTX-I 经 Tricine SDS-PAGE 质谱鉴定,氨基酸组成分析,N-端序列测定及活性鉴定,证明已获得高纯度的重组 HWTX-I。摇瓶表达量约为 80mg/L,约占总分泌量的 23.6%,并对摇瓶发酵条件进行了优化,为利用基因工程方法生产 HWTX-I 的规模化生产及临床应用提供了证据。

**关键词** 重组虎纹捕鸟蛛毒素-I (rHWTX-I), *Pichia pastoris*, 分泌表达, 分离纯化

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)02-0172-06

虎纹捕鸟蛛毒素-I (Huwentoxin-I, 简称 HWTX-I) 是从中国珍稀毒蜘蛛种虎纹捕鸟蛛 (*Selecocosmia huwena*) 粗毒中分离纯化的一种多肽类神经毒素,其相对分子质量为 3.75kD,由 33 个氨基酸残基组成,其 6 个半胱氨酸残基以 1-4, 2-5, 3-6 方式连接形成二硫键。HWTX-I 由于分子量小,高稳定,不易失活,因而是一种进行蛋白质工程改造的较理想模型<sup>[1]</sup>,同时其生物学活性表明 HWTX-I 是一种 N-型  $\text{Ca}^{2+}$  离子通道的阻断剂<sup>[2]</sup>,因而是一种研究离子通道与受体相互作用的极好工具试剂。最近研究表明 HWTX-I 有明显的镇痛活性,可能被开发成一种新型的镇痛药物,有着潜在的临床应用价值。

但由于虎纹捕鸟蛛分布范围小,仅靠天然资源远不能满足对毒素的全面研究和开发利用,本室李敏<sup>[3]</sup>等报道了 HWTX-I 基因在大肠杆菌中的融合表达,但由于大肠杆菌不具备蛋白质翻译后加工能力,且需复性才能形成有活性的蛋白质。同时,大肠杆菌表达系统还存在内毒素污染等问题,影响了表达产物的临床应用。毕赤酵母表达系统是一种新型外源基因表达体系,兼有原核细胞良好的可操作性,和真核系统的翻译后加工的双重特点,且具有高稳定、高表达、高分泌等特点,适合表达含二硫键丰富的蛋白质<sup>[4]</sup>。我们在 *P. pastoris* 系统中表达了

HWTX-I,摇瓶表达量为 80mg/L,约占分泌蛋白 23.6%,并对发酵条件进行了优化。

### 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 BCA-200™ Protein Assay Kit 购自 PIERCE 公司,阳离子交换柱 CM,反相 HPLC YWG  $\text{C}_{18}$  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 HWTX-I 的表达** 将 HWTX-I 表达菌株 *P. pastoris* GS115/HWTX-I,空载体菌株 G9k,宿主菌 GS115 分别接种于 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,0.1mol/L 磷酸钾缓冲液 pH6.0,13.4g/L YNB,  $4 \times 10^{-5}$ g/L 生物素,10g/L 甘油)的 500mL 三角瓶。30℃ 250r/min 培养至  $A_{600} 3 \sim 6$ 。室温(20℃)5000r/min 离心 5min,收集菌体并用 20mL BMMY(BMGY 中 10g/L 甘油由

收稿日期 2001-08-06,修回日期 2001-10-20。

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No.39670392)。

\* 通讯作者。现在福建师范大学生物工程学院工作。

Tel 86-591-34427 Fax 86-591-3442620 E-mail nmh2@sina.com

©中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

5mL/L 甲醇代替)重悬细胞后 28℃ 300r/min 诱导 6d 每 24h 补加甲醇至 5mL/L,同时 4℃ 12 000r/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<sup>[5]</sup>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 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 沉淀:** 收集的发酵上清液用 90% 饱和度的 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 细粉末沉淀,于 4℃ 的冰箱中过夜,然后以 12 000r/min 30min 离心收集沉淀,将沉淀溶于 0.1mol/L 的磷酸钾缓冲液中(pH7.0)。

**1.2.4 超滤脱盐:** 用对分子量 3kD 排阻的滤膜(MWCO3kD)超滤脱盐,7000r/min 30min 离心脱盐 3 次,收集上部液体。

**1.2.5 CM 阳离子交换 HPLC:** 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。

**1.2.6 C<sub>18</sub> 反相 HPLC 纯化:** 10u YWG C<sub>18</sub>(3.9 × 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,收集各峰进行质谱检测。

**1.2.7 质谱鉴定:** 在 Bruker 公司 ProFlex III 型 MALDI-TOF 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 所得各峰与基质液混合后,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。

**1.2.8 蛋白质含量检测:** 采用 PIERCE 公司的 PIERCE BCA™-200 Protein Assay Kit 试剂盒,按参考说明书进行。

**1.2.9 氨基酸组成分析:** 样品 10nmol 置于水解小管中真空冻干后放入 WATERS Pico-tag 水解瓶中,瓶底加入 200μL 5.7mol/L 的重蒸 HCl(含 0.5% 重蒸苯酚)反复充 N<sub>2</sub> 抽真空,最后在真空状态下封口,105℃ 水解 24h,水解好样品真空抽干除 HCl 后,加入干燥液(水:三乙胺:乙醇 = 1:1:2)混合均匀后冻干,再加入衍生剂(PITC:水:三乙胺:乙醇 = 1:1:1:7)室温下衍生 20min,真空抽干 4h 最后用样品稀释液

(5mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,用 10% 磷酸(含 5% 乙腈)调 pH7.4)稀释混匀,离心后取上清分析仪器为 WATERS Alliance HPLC 系统,色谱柱为 10u YWG C<sub>18</sub>柱(3.9 × 300mm)。

**1.2.10 重组 HWTX-I N 端氨基酸序列分析:** 在 Applied Biosystem 公司 491 型氨基酸序列分析仪上用 Edman 自动降解法进行,一次测出 N 端 24 个氨基酸序列。

**1.2.11 生物活性检测:** 参照 Sally A. Waterman<sup>[6]</sup>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% O<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub> 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 1 次,用二道生理记录仪记录其阻断强度。

## 2 结果

### 2.1 rHWTX-I 在 *P. pastoris* 中表达

出发菌株 *Pichia pastoris* GS115(his<sup>4</sup> Mut<sup>+</sup>)为甲醇利用型,能以甲醇作为唯一碳源和能源生长。同时甲醇又作为诱导剂诱导外源蛋白的表达,通过对宿主菌 GS115,对照空载体菌 G9k,及基因工程菌株(His<sup>+</sup> Mut<sup>+</sup>)发酵上清的 Tricine SDS-PAGE 电泳分析表明(图 1):基因工程菌株的发酵上清在 3.5 ~ 6.1 kD 之间有一条很浓的带,而宿主菌和空载体菌 G9k 在此处无带,经扫描成像系统及蛋白质分析软件分析,该带约占总分泌蛋白的 23.6%,同时经蛋白质含量分析,摇瓶发酵的表达量为 80mg/L。

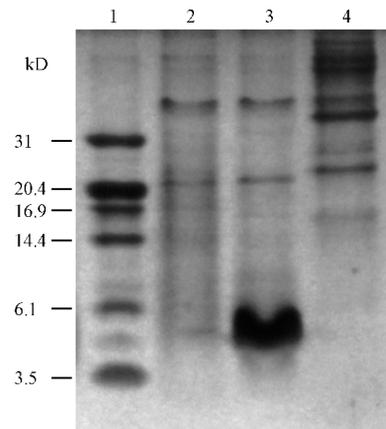


图 1 rHWTX-I 表达的 Tricine SDS-PAGE 分析  
Fig. 1 Tricine SDS-PAGE of rHWTX-1 secreted by GS115(His<sup>+</sup> Mut<sup>+</sup>)

1. Low molecular Marker; 2. G9K; 3. GS115/HWTX-1; 4. GS115

### 2.2 rHWTX-I 的分离与纯化

**2.2.1 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 沉淀及超滤:** 100mL 的发酵液用

90% 饱和度的  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  细粉沉淀。置于 4℃ 冰箱中过夜后, 12 000 r/min 离心 30min 收集沉淀溶于 25mL ddH<sub>2</sub>O 中, 取样用 BCA™-200 Protein Assay Kit

分析, 蛋白质的平均回收率为 15% ~ 20% (见表 1) 回收率偏低, 但仍能有效浓缩发酵液, 但用超滤脱盐时( MWCO 3kD) 回收率可达 84%, 且能有效脱盐。

表 1 重组虎纹捕鸟蛛毒素- I 的纯化

Table 1 Purification of rHWTX- I expressed in *P. pastoris*

Purification steps	Volume /mL	Protein concn ( mg/mL )	Total protein /mg	Recovery rate /%	Purification fold
Culture supernatant	100	7.0	700		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation	25	4.2	105.0	15.0	6.6
Ultero filtration	34	2.6	88.4	84.0	1.2
CM ion exchange	20	1.6	32.0	37.0	2.8
RP HPLC C <sub>18</sub>	8	1.0	8.0	16	6.4

2.2.2 CM 阳离子交换: 利用 BMMY 培养基培养 *P. pastoris* 生产 rHWTX- I, rHWTX- 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(图 2)后得到三个峰, 其中第一个峰为不被吸附的杂蛋白和大量黄色色素分子, F<sub>2</sub> 峰为 4.062kD 及 3.75kD 的成分, F<sub>3</sub> 为 4.289kD 的峰, 质谱显示为单一峰。

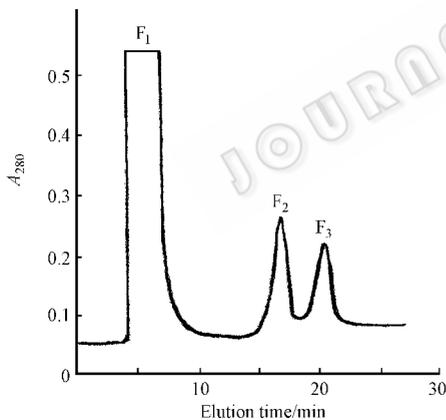


图 2 脱盐后上清液的阳离子交换图

Fig.2 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

2.2.3 反相 HPLC 及质谱: 阳离子交换峰 F<sub>3</sub> 仍含大量的盐分, 不利于活性测定。故对其进行反相 HPLC C<sub>18</sub> 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 4.289kD, 与预期结果一致: 3.750kD (HWTX-I) + 0.16509(F) + 0.14708(E) + 0.11709(V) + 0.18109(Y) = 4.28835kD,

其纯度达 95% 以上。

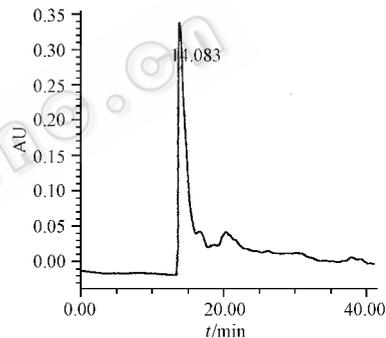


图 3 rHWTX- I 的反相 HPLC 图

Fig.3 Purification of rHWTX- I by reversed Phase HPLC

The ion exchange HPLC fraction eluting at 22.75min( Fig2 ) was applied to a YWGC<sub>18</sub>( 3.9 × 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

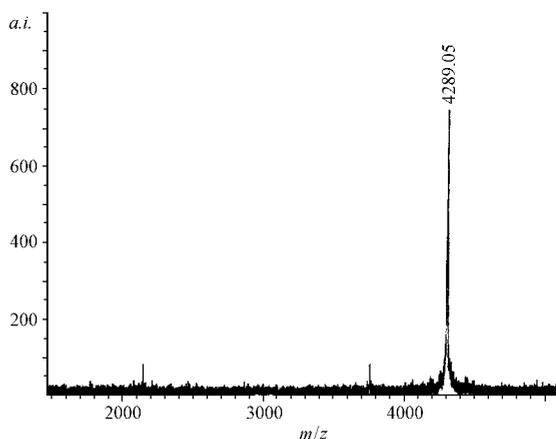


图 4 rHWTX- I 的质谱分析

Fig.4 MALDI-TOF Mass Spectra of recombinant rHWTX- I

**2.2.4 氨基酸组成分析:**对反相 HPLC 纯化得所的分子量 4.289kD 样品进行氨基酸组成分析表明, rHWTX-I 比天然 HWTX-I 多了一个 F, 一个 E, 一个 V, 一个 Y, 其余氨基酸组成与 HWTX-I 完全一致。

**2.2.5 氨基酸序列分析:**指导 rHWTX-I 分泌到胞外的天然  $\alpha$ -因子前导肽包含三个信号肽酶切位点, 其中一个为 Kex2 断裂位点, 另两个为 Ste13 酶切位点。所测得的 rHWTX-I 纯化样品 N 端 24 个氨基酸序列比天然的 HWTX-I 多出了 4 个氨基酸 (YVEF), 这是第二位的 Ste13 信号肽酶在 A-Y 之间切除信号肽后留下的 4 个氨基酸残基, 剩下的 20 个氨基酸残基序列与已知天然 HWTX-I 的序列完全一致。说明 HWTX-I 基因在 *P. pastoris* 中有正确表达, 且有正确分泌与切割。

Native HWTX-I : ACKGVFDACTPGKNECCPNR

RHWTX-I : YVEFACKGVFDACTPGKNECCPNR

**2.2.6 活性分析:**将表达的 rHWTX-I 用 Krebs 液配成浓度为  $1 \times 10^{-5}$  g/L, 取 3mL 浸泡小鼠输精管离体标本, 给予电刺激, 同时记录其阻断时间, 与天然的 HWTX-I 进行比较, 结果显示天然 HWTX-I 平均阻断时间为  $10\text{min} \pm 2\text{min}$ , 而 rHWTX-I 的平均阻断时间为  $14\text{min} \pm 2\text{min}$ , 表明其活性为天然毒素活性的 70% (图 5)。

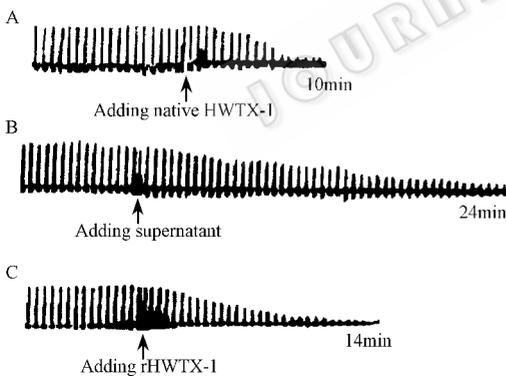


图 5 rHWTX-I 对小白鼠离体输精管神经肌肉接头神经传导的影响

Fig.5 Effect of recombinant rHWTX-I on neuromuscular transmission in isolated mouse spermiduct

1. Native HWTX-I ; 2. Supernatant ; 3. RHWTX-I

**2.2.7 rHWTX-I 发酵条件的初步探索:**

(1) 不同的起始  $A_{600}$ , 不同时间点对 rHWTX-I 表达量的影响: *P. pastoris* 中蛋白表达分二个阶段, 一阶段是在含甘油的培养基中生长菌体, 待  $A_{600}$  达 2~8 时再离心收集菌体, 然后在含甲醇的培养基中诱导外源基因表达, 对诱导前不同的  $A_{600}$  的探索表明 (图 6) 随着菌体密度的增加, 表达量几乎

呈线性增加。

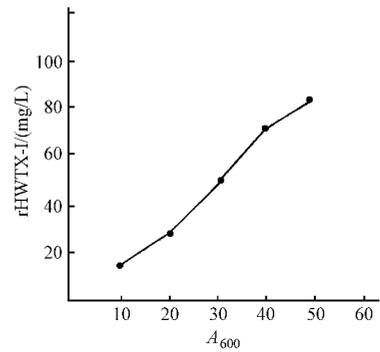


图 6 不同的生物量对 rHWTX-I 表达量的影响 (n=5)

Fig.6 Influence of biomass concentration on rHWTX-I expression

将诱导前细胞  $A_{600}$  30 为起始密度的表达菌株连续培养 6d, 结果表明 (图 7) 表达量随着时间延长而有逐渐升高的趋势, 第 5、6 天表达量最高, 但考虑到防止目的蛋白降解, 选择第 5 天作为最佳表达时间点。

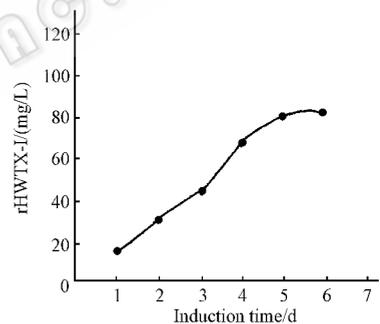


图 7 不同的诱导时间点对 rHWTX-I 表达量的影响 (n=3)

Fig.7 Influence of induction time on rHWTX-I expression

(2) 不同的培养基对 rHWTX-I 表达量的影响: 不同的培养基配方, 不同的发酵参数主要是通过提高细胞的绝对总数来提高外源蛋白的产量, *P. pastoris* 中的诱导培养基主要有 BMM (与 BMMY 比不含蛋白胨和酵母提取物) 和 BMMY。通过对相同密度  $A_{600}$  的基因工程菌株在 BMM 和 BMMY 中培养 5d 后收集发酵液测蛋白质含量。结果表明: rHWTX-I 在 BMMY 中表达量为在 BMM 中表达量的 10 倍。

(3) 不同的 pH 值对表达量的影响: 用磷酸或 KOH 将诱导培养基 BMMY 的 pH 值调 3.0、5.0、6.0、8.0, 在相同  $A_{600}$  下培养 5d, 结果表明: 在 pH3.0 pH6.0 时表达量最高, 在 pH8.0 时, rHWTX-I 表达量最少, 通过 BCA 试剂盒分析各发酵上清中蛋白质含量后表明: pH 值为 6.0, rHWTX-I 的表达量比 pH8.0 提高了 2 倍多。

表 2 BCA 分析 pH 对 rHWTX- I 表达的影响

Table 2 Analysing the influence of initial pH on the expression product by BCA assay

Sample	pH3.0	pH5.0	pH6.0	pH8.0
A <sub>562</sub>	0.531	0.425	0.712	0.331

### 3 讨 论

*Pichia pastoris* 表达系统是近年来发展很快的一个真核表达系统,它非常适合真核蛋白的表达,表现在其很强的真核蛋白质修饰功能上,它不存在原核表达系统中重组蛋白质正确折叠和糖基化等后处理问题,此外,由于 *P. pastoris* 在诱导阶段自身分泌蛋白少,因此在分离纯化方面也具有明显的优势,外源蛋白在 *P. pastoris* 中表达成功的报道很多,表达量最高的可达 12g/L<sup>[7]</sup>,我们通过基因重组的方法在 *P. pastoris* 中成功表达了 rHWTX- I,摇瓶发酵约为 80mg/L,同时,对诱导发酵条件进行初步探索表明,最佳表达时间点为 5d,最佳 pH 值为 6.0。在 rHWTX- I 的纯化过程中,我们对目的蛋白的等电点首先在蛋白质分析软件上进行了预测,其等电点约为 8.4。所以在纯化过程中,我们采用了 CM 阳离子交换柱,结果表明该步骤不仅能有效地去除培养基中的全部色素。而且能去除不被吸附的杂蛋白,且能有效分离目的蛋白。由于 rHWTX- I 分子量小,这给发酵液的浓缩带来了很大困难,我们分别采用 90% 饱和度的 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6 倍体积的预冷丙酮,和冷酸性丙酮/甲醇沉淀发酵上清,但其回收率均只有 20% 左右,选用 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 沉淀时,采用延长沉淀时间, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 尽量研成细粉和缓慢加入的方法,目的蛋白的回收率可提高 5% 左右,但丙酮沉淀的效率要比 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 沉淀的效率高出 2.4 倍,但其主要缺点是难于溶解,这给以后的分离纯化工作带来了困难。用巴氏毕赤酵母表达异源蛋白,经常遇到的另一问题是胞外蛋白水解酶问题。由于 *P. pastoris* 工程菌通过甲醇诱导后,胞外发酵液中存在许多蛋白水解酶,所表达的重组蛋白会部分甚至全部被降解而得不到很高的表达量。这个问题对表达小分子多肽尤为明显。Cregg 等<sup>[9]</sup>认为可以通过诱导时添加保护剂,选择最佳诱导时间和选择蛋白酶缺陷的宿主等来解决。本文研究 rHWTX- I 的表达时发现,通过改变诱导的起始 pH,可使表达量提高。最近邱

荣德等<sup>[10]</sup>在研究人 p53 蛋白在 *P. pastoris* 中表达时也获得类似的结果,表明诱导时 pH 的控制可能是 *P. pastoris* 系统高效表达重组蛋白的关键之一。

目前,有关肽类神经毒素在 *P. pastoris* 中表达的报道很少,2000 年王维民<sup>[8]</sup>等在 *P. pastoris* 中表达了青岛海葵强心活性多肽,表达量为 7mg/L,本文首次报道了虎纹捕鸟蛛毒素 I 在 *P. pastoris* 中的表达,摇瓶发酵达 80mg/L,如能配以计算机控制的发酵罐发酵,通过控制溶氧量, pH 值等条件,目的蛋白的表达量将会达到更高水平。

### REFERENCES (参考文献)

- [1] Liang S P, Zhang D Y, Pan X. Properties and amino acid sequence of Huwentoxin- I, a neurotoxin purified from the venom of the Chinese bird spider Selenocosmia huwena. *Toxicon*, 1993, **31** (8): 969 ~ 974
- [2] K Peng, Liang S P. The effect of Huwentoxin- I on Ca<sup>2+</sup> channels in differentiated NG108-15 cells: a patch-clamp study. *Toxicon*, 2001, **39**: 491 ~ 498
- [3] Min Li, Lu Yi Li, Xiu Shan Wu. Cloning and functional expression of a synthetic gene encoding Huwentoxin- I, a neurotoxin from the Chinese bird spider. *Toxicon*, 2000, **38**: 153 ~ 162
- [4] OUYANG L M (欧阳立明), ZHANG H X (张惠展), ZHANG S I (张嗣良). Advances in studies of *Pichia pastoris* as a heterologous gene expression system. *Progress in Biochemistry and Biophysics* (生物化学与生物物理进展), 2000, **27** (2): 151 ~ 154
- [5] Schagger H, Jagow G V. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100kDa. *Analytical Biochemistry*, 1997, **166**: 368 ~ 379
- [6] Sally A, Waterman. Role of N-, P- and Q-type voltage-gated Calcium in transmitter release from sympathetic neurones in the mouse isolate was deferens. *British Journal of Pharmacology*, 1997, **120**: 393 ~ 398
- [7] Clare J J, Rayment F B, Ballantyne S P et al. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integration of the gene. *Bio/Technology*, 1991, **9**: 455 ~ 460
- [8] WANG W R (王维荣), LIU A M (刘爱民), QIAN Z K (钱志康). Cloning of a synthetic gene coding for cardiotoxic polypeptide anothopleurin-QD2 and expression in *Pichia pastoris*. *Progress in Biochemistry and Biophysics* (生物化学与生物物理进展), 2000, **27** (4): 407 ~ 411
- [9] Cregg J M, Vedvick T S, Raschke W C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*, 1993, **11**: 905 ~ 910
- [10] QIU R X (邱荣德), ZHU J R (朱建蓓), WANG I (王垒) et al. Expression of Recombinant Human p53 in Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 1999, **15** (4): 477 ~ 481

## Expression and Purification of Recombinant Huwentoxin- I in *Pichia pastoris*

NIE Dong-Song<sup>1</sup> LI Min<sup>1,2\*</sup> XU Hui-Ming<sup>1</sup> HE Ning-Jia<sup>1</sup> LIANG Song-Ping<sup>1</sup>

<sup>1</sup>( College of Life Science , Hunan Normal University , Changsha 410081 , China )

<sup>2</sup>( College of Biological Engineering , Fujian Normal University , Fuzhou 350007 , China )

**Abstract** HWTX- I is a peptide neurotoxin purified from the crude venom of the Chinese bird Spider *Selenocosmia Huwena* , which has analgesic activity. rHWTX- I expressed by *P. pastoris* and secreted to culture supernatant was first precipitated by  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  , then it was isolated and desalted by ultrafiltration following by ion exchange chromatography of CM column , after reverse phase HPLC of  $\text{C}_{18}$  column and vacuum drying , the pure HWTX- I protein was obtained which was proved to be recombinant HWTX- I by Tricine SDS-PAGE , MALDI-TOF mass spectrometry , amino acid composition analysis , the N-terminal amino acid sequence and its biological activity. The final yield of the purified HWTX- I was about 80mg/L accounting for 23.6% of its total secretory proteins.

**Key words** rHWTX- I ( recombinant Huwentoxin- I ) , *Pichia pastoris* , secretory expression , separation and purification

Received : 08-06-2001

This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation( No.39670392 ).

\* Corresponding author. Tel 86-591-3425127 ; Fax 86-591-3442620 ; E-mail ml2@sina.com

## 抗癌药物紫杉醇的微生物生产有望

紫杉(Taxus)或称红豆杉,在民间,曾用其枝叶做成汤治胃病。它的木材坚实,埋入地下10年不朽,表明其木质优良及其所含某些成分具有抗腐蚀能力。从其树皮中提取的紫杉醇(Taxol),制成药剂,每克售价达2000美元。由于它是一种新型有效抗癌药物,2000年全球紫杉醇针剂销售额达20多亿美元。正因为有如此可观的经济效益和社会效益,研究人员除了从紫杉树皮中提取紫杉醇之外,用红豆杉植物组织培养生产紫杉醇(1~3mg/L)也取得一定进展。尽管如此,组培生产紫杉醇的产率仍有一个提高的问题。研究者发现中国的红豆杉(*Taxus chinensis*)愈伤组织所含紫杉醇远远高于其他国家的紫杉,是何原因尚有待进一步研究。要提高组培紫杉醇产率,有两点值得注意(1)选择优质紫杉树种或培育良种,其细胞分化力强,并易于固定化于载体上有利于紫杉醇生产(2)优化组培的各种条件,据称,在培养基中添加苯丙氨酸,可促进紫杉醇生成,而不降低细胞生长速度,苯丙氨酸是紫杉醇生物合成的前体。我国一些研究单位在这方面的研究成果为紫杉醇的商业性生产奠定了一定的基础。

微生物生产紫杉醇的研究在《生物工程学报》(2002,18(1):54)作了简介,美国Montana州立大学研究人员几年前从太平洋紫杉(*Taxus brevifolia*)韧皮部中分离出一种紫杉霉叫*Taxomyces andreanae*,生产的紫杉醇,其药效如同源于植物性紫杉醇,但产率很低,仅为24ng/L~50ng/L(1993)。1996年从另一种紫杉中分离到的一种紫杉醇产生菌叫*Pestalotiopsis microsora*。在我国,除北京大学、中科院成都生物研究所等研究单位获得类似结果(其发酵液中紫杉醇含量为2.3μg/L)之外,可喜的是,黑龙江大学生命科学学院一个研究组通过遗传工程技术与传统育种技术结合选育出一种高产紫杉醇的产生菌,命名为HQD33菌株,它是何种菌以及其种属等有待进一步鉴定。该菌培养液可从中获取紫杉醇448.5μg/L,已进入中试阶段,预计5年内有望实现工厂化生产。要使紫杉醇微生物生产进入商业化、产业化(1)良种选育是基础,必须有优质的“种子”(2)以现代生物技术提升紫杉醇产生菌或生产菌的潜力(3)抗癌药效与源于植物或化学合成或生物合成的具有同等效力,这样微生物生产紫杉醇的技术才具有生命力。

(柯为)