

Intein 介导的重组昆虫毒素 *BmK IT* 在大肠杆菌中的可溶性表达、纯化及活性分析

Soluble Expression ,Purification and Characterization of *BmK IT* in *Escherichia coli* by Intein-mediated System

许成钢 范晓军 张志云 付月君 梁爱华*

XU Cheng-Gang FAN Xiao-Jun ZHANG Zhi-Yun , Fu Yue-Jun and LIANG Ai-Hua*

山西大学生物技术研究所 ,化学生物学与分子工程教育部重点实验室 ,太原 030006

Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education ,Institute of Biotechnology ,Shanxi University ,Taiyuan 030006 ,China

摘 要 为获得重组昆虫毒素 *BmK IT* 通过 PCR 方法在 *BmK IT* 基因的 3' 端融合了编码 6 个组氨酸残基的核苷酸序列 ,将其插入原核表达载体 pTWIN1 的内含肽 Ssp DnaB Intein 基因下游的多克隆位点 (MCS) 。将获得的表达质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 中 ,用 IPTG 诱导融合蛋白表达。用 Ni-NTA 亲和层析柱从菌体裂解液中纯化了 CBD-Intein-*BmK IT*_{his6} 融合蛋白 ,并在柱上诱导 Intein 自剪切 ,成功去除融合子 CBD-Intein。通过 Superdex 75 凝胶过滤层析获得了纯度达 95% 以上的 *BmK IT*_{his6} 蛋白 ,该蛋白不仅具有正确的二级结构而且有生物活性。

关键词 东亚钳蝎昆虫毒素 ,原核表达 ,Intein 自剪切 ,虫试实验

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)06-0989-06

Abstract To produce recombinant *Buthus martensii* Karsch insect toxin (*BmK IT*) ,*BmK IT* cDNA which fused a hexahistidine sequence at the C-terminus by PCR was inserted into pTWIN1 expression vector fused in frame with an upstream Ssp DnaB intein gene. The expression plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) strain and protein expression was induced by IPTG. The CBD-Intein-*BmK IT*_{his6} fusion protein was purified from cell lysates using Ni-NTA resin affinity chromatography. The intein was removed from fusion protein by on-column intein-mediated cleavage. *BmK IT*_{his6} was purified through Superdex 75 gel chromatography to more than 95% homogeneity. The purified protein has both correct secondary structure and insecticidal activity.

Key words *Buthus martensii* Karsch insect toxin (*BmK IT*) , prokaryotic expression , intein self-cleavage , insect bioassay

蝎毒素主要是一些多肽类物质 ,一般含有 30 ~ 70 个氨基酸残基以及 3 ~ 4 对二硫键。这类毒素特异性地作用于哺乳动物、昆虫和甲壳类动物神经组织的离子通道^[1]。蝎毒素中的昆虫特异性毒素专一

作用于昆虫而对哺乳动物无害 ,因此在其作用机理研究和新型生物杀虫剂开发利用方面倍受关注^[2]。但是 ,蝎毒素中 ,昆虫特异性毒素含量很少 ,仅占蝎粗毒的 1% ,因而其结构和功能及其应用等研究受

Received : March 8 , 2007 ; Accepted : April 10 , 2007 .

This work was supported by the grants from the National Natural Science Foundation of China (Nos. 30700534 , 30670282 and 30470239) and Natural Science Foundation of Shanxi Province (Nos. 20051065 and 20041033) .

* Corresponding author. Tel : + 86-351-7018731 ; E-mail : aliang@sxu.edu.cn

国家自然科学基金资助项目 (Nos. 30700534 , 30670282 and 30470239) , 山西省自然科学基金项目资助 (Nos. 20051065 and 20041033) .

到很大的限制。目前国际上兴奋型昆虫毒素中只有两个毒素的蛋白质结构被解析出来,即 Bj-xtrIT^[3]和 BmK IT-AP^[4]。近年来,国际上已有将蝎昆虫毒素基因重组到大肠杆菌^[5-10]、酵母^[11]及真核细胞^[12-14]中进行表达研究,也有将其导入植物中,构建转基因抗虫植物的研究报道^[15-17],还有将其重组到杆状病毒基因组中以提高其杀虫效果^[18,19]。

BmK IT 最初是从广泛分布于我国的东亚钳蝎 *Buthus martensii* Karsch (BmK) 中分离得到的一种兴奋型昆虫毒素,该毒素与昆虫的钠离子通道上特异性的受体结合,能够引起昆虫的快速兴奋收缩麻痹。BmK IT 属于长链毒素,含有 69 个氨基酸残基,分子内形成 4 对二硫键^[20]。1999 年梁爱华等通过 RT-PCR 的方法获得了该毒素的基因序列^[21],本研究将 BmK IT 基因重组到原核表达载体 pTWIN1 中,并使表达产物在其 C 端融合了 6 个组氨酸残基,与内含肽 Ssp DnaB Intein 融合表达。通过体外诱导内含肽自剪切,获得了纯的可溶性的 BmK IT,并具有正确的二级结构和杀虫活性。为利用基因工程手段获得重组蝎昆虫毒素进而开展该毒素的结构与功能及其应用研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 载体与菌株

含有目的基因 BmK IT 的载体 pExSecI-BmK IT 由本室构建^[21],表达载体 pTWIN1 购自 New England 公司, *E. coli* DH5 α 和 BL21(DE3) 菌株由本室保藏。

1.2 试剂

Nco I、*Pst* I、DNA 聚合酶 Ex Taq 和 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa; IPTG 和蛋白质分子量标准为 Promega 产品;质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司;Ni-NTA 树脂购自 QIAGEN 公司;抗 His 单克隆抗体和 AP 标记的羊抗小鼠 IgG 分别购自 Clontech 和 Sino-American 生物技术公司。其他化学试剂均为分析纯,购自上海生工有限公司。

1.3 表达载体 pTWIN1-BmK IT_{his6} 的构建

从质粒 pExSecI-BmK IT 中经 PCR 扩增出 BmK IT 基因。上游引物为 5'-C TGA GCC ATG GGC AAG AAG AAT GGA TAC GCT-3', 下游引物为 5'-CG GCG CTG CAG TTA ATG ATG ATG ATG ATG ATG ACC AAT TAT TTG GAC GTC-3'。分别在上下游引物的 5' 端引入限制性内切酶 *Nco* I 和 *Pst* I 的识别序列,并且在下游引物 5' 端加上编码 6 个组氨酸残基的互补

序列。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后切胶回收,再用 *Nco* I 和 *Pst* I 双酶切,与经过相同双酶切的载体 pTWIN1 连接,对重组质粒进行 PCR 和双酶切鉴定,然后进行基因测序,筛选得到的重组载体命名为 pTWIN1-BmK IT_{his6} (Fig. 1)。

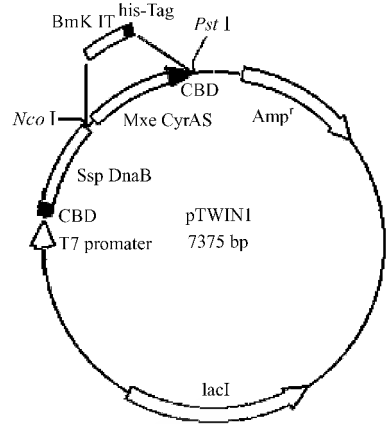


图 1 表达质粒 pTWIN1-BmK IT_{his6} 的构建

Fig. 1 Construction of the expression vector pTWIN1-BmK IT_{his6}

1.4 融合蛋白 CBD-Intein-BmK IT_{his6} 的表达

将重组质粒 CBD-Intein-BmK IT_{his6} 转化到大肠杆菌 BL21(DE3) 中,挑取单菌落接种至含氨苄青霉素 (50 μ g/mL) 的 5mL LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 A₆₀₀ 达到 0.6 时,加入终浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0mmol/L IPTG,25 $^{\circ}$ C 培养 8h,15% SDS-PAGE 检测 CBD-Intein-BmK IT_{his6} 的表达。同时,在 IPTG 终浓度为 0.5mmol/L 培养温度分别为 16、20、25、30 和 37 $^{\circ}$ C 的条件下,其中 16 和 20 $^{\circ}$ C 诱导 12h 过夜,25 和 30 $^{\circ}$ C 诱导 8h,37 $^{\circ}$ C 诱导 6h。离心收集各菌体细胞并超声破碎,离心得上清和沉淀,15% SDS-PAGE 检测。

1.5 BmK IT_{his6} 的纯化

取 100mL 在 0.4mmol/L IPTG 终浓度下 16 $^{\circ}$ C 过夜诱导表达后的工程菌 8000r/min 离心收集菌体,将菌体重悬于预冷的裂解缓冲液 (50mmol/L NaH₂PO₄, pH 8.5, 10mmol/L 咪唑) 中,冰浴超声破菌,4 $^{\circ}$ C, 15000 r/min 离心 30min。首先对诱导 Intein 自剪切的 pH 值进行优化,取少量上清调节 pH 值分别到 8.5、8.0、7.5、7.0、6.5、6.0 和 5.5,诱导 Intein 自剪切 24h 后,16% Tricine-PAGE 检测切割效率。

将上清液上样于 1mL 的 Ni-NTA 亲和柱,然后用 10 倍柱床体积的洗涤缓冲液 (50mmol/L NaH₂PO₄, pH 6.5, 300mmol/L NaCl, 20mmol/L 咪唑) 洗涤亲和柱,在 pH 6.5 室温条件下,诱导 Intein 自剪切 24h。待 Intein 切割后,再用 10 倍柱床体积的洗涤缓

冲液洗涤亲和柱,最后用洗脱缓冲液(50mmol/L NaH_2PO_4 , pH 6.5, 800mmol/L 咪唑),洗脱下来的目的蛋白通过 16% Tricine-PAGE 检测。

洗脱下来的目的蛋白经过 Superdex 75 凝胶过滤层析进一步纯化,使 CBD-Intein-*BmK IT*_{his6} 与 *BmK IT*_{his6} 分离,收集目的峰,超滤浓缩,以 Bradford 法测定蛋白浓度。

1.6 重组蛋白的 Western 印迹鉴定

重组蛋白的 Western 印迹鉴定参考文献 [22] 方法进行,一抗为小鼠抗 His 单克隆抗体,二抗为羊抗鼠辣根过氧化物酶标记的 IgG, DAB 显色。

1.7 *BmK IT*_{his6} 圆二色光谱的测定

将纯化好的目的蛋白 *BmK IT*_{his6} 用 10mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.0)配制成 16 μ mol/L 的蛋白样品。圆二色光谱的测量在 Jasco J-810 圆二色光谱仪上进行,光源系统用氮气保护(流量为 5L/min),采用 1mm 光径样品池。测量参数为:波长扫描范围 250 ~ 190nm,扫描速率 100nm/min,分辨率 0.1nm,响应时间 1s,累积次数 3 次。利用圆二色光谱仪附带的杨氏法二级结构分析软件对实验数据进行各种二级结构含量的估算。

1.8 重组蛋白的生物学活性测定

以 pTWIN1/*E. coli* BL21 细胞裂解上清为对照,对纯化的 CBD-Intein-*BmK IT*_{his6} 融合蛋白和 *BmK*

*IT*_{his6} 进行虫试实验,棉铃虫由中国农科院植物保护所提供。0.5g 饲料中分别加入纯化后的 CBD-Intein-*BmK IT*_{his6}(浓度为 1.0nmol 蛋白/g 饲料)和 *BmK IT*_{his6}(浓度为 1.0 和 2.0nmol 蛋白/g 饲料)对二龄幼虫进行喂养。棉铃虫置于 25 $^{\circ}\text{C}$, 14h:10h(白天:黑夜)循环的人工环境中饲养。每隔 12h 记录棉铃虫存活数量,120h 后终止实验并计算半数致死时间 LT_{50} 。本实验每个实验组含有 20 头棉铃虫,重复 3 次。

2 结果

2.1 融合蛋白 CBD-Intein-*BmK IT*_{his6} 的表达

将经过 PCR 和双酶切鉴定以及基因测序筛选出的重组质粒 pTWIN1-*BmK IT*_{his6} 转化到大肠杆菌 BL21 中进行表达。SDS-PAGE 结果表明,不同 IPTG 浓度诱导下,在分子量 35 kD 附近均有一特异条带,与预测的融合蛋白 CBD-Intein-*BmK IT*_{his6} 分子量 36 kD 基本相符,并且 IPTG 终浓度为 0.4mmol/L 时,目的蛋白表达量达到最大(Fig. 2A)。当 IPTG 浓度相同,而诱导温度不同时,可溶性目的蛋白占总表达量的比例也不一样,16 $^{\circ}\text{C}$ 诱导时可溶性目的蛋白的含量最大,大于 60%,而 37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导时,可溶性目的蛋白几乎没有(Fig. 2B)。因此,融合蛋白 CBD-Intein-*BmK IT*_{his6} 的表达的条件选择为 0.4mmol/L IPTG, 16 $^{\circ}\text{C}$ 过夜诱导。

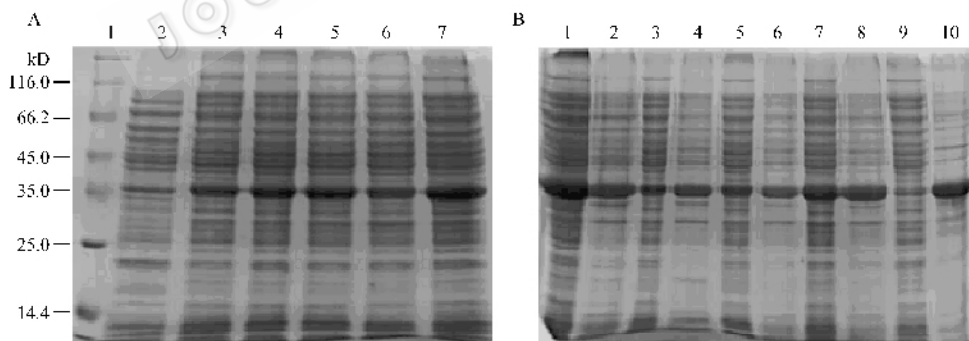


图 2 融合蛋白 CBD-Intein-*BmK IT*_{his6} 表达条件的优化

Fig. 2 Optimization of expression condition of fusion protein CBD-Intein-*BmK IT*_{his6}

A SDS-PAGE analysis of CBD-Intein-*BmK IT*_{his6} induced by different concentration of IPTG. 1: marker; 2~7 induced by different IPTG concentration (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0mmol/L) at 25 $^{\circ}\text{C}$. B SDS-PAGE analysis of CBD-Intein-*BmK IT*_{his6} induced by 0.5mmol/L IPTG at different temperature. 1, 3, 5, 7 and 9: soluble fractions of crude protein extracts induced at different temperature (16, 20, 25, 30 and 37 $^{\circ}\text{C}$); 2, 4, 6, 8 and 10: insoluble fractions induced at different temperature (16, 20, 25, 30 and 37 $^{\circ}\text{C}$).

2.2 *BmK IT*_{his6} 的纯化

pH 值对 Intein 自剪切的效率影响很大,通过 Tricine-PAGE 发现,融合蛋白 CBD-Intein-*BmK IT*_{his6} 在所有样品中都发生切割,分别产生约 28 和 9 kD 的两条带,在 pH 6.5 时,剪切效率最高(Fig. 3)。

100mL 工程菌所得目的蛋白上清经过 Ni-NTA 亲和柱上诱导 Intein 自剪切后,获得约 1.8 mg *BmK IT*_{his6},纯度大约在 70% 左右,杂蛋白主要为未切割的融合蛋白 CBD-Intein-*BmK IT*_{his6} 和切割产生的 CBD-Intein(Fig. 4A)。将亲和层析后样品进行浓缩经

Superdex 75 凝胶过滤层析, 结果发现, 含有 *BmK IT_{his6}* 目的蛋白的有三个峰, 分别为峰 2, 3 和 4 (Fig. 4B) 根据分子量大小推断分别为四聚体、二聚体和单体, 收集峰 4, 得到纯度约为 95% 左右的 *BmK IT_{his6}* 目的蛋白 (Fig. 4A lane 10)。

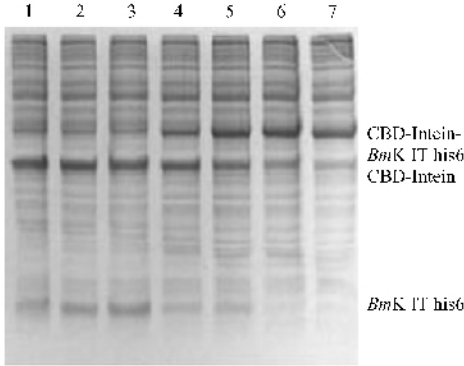


图 3 不同 pH 诱导 CBD-Intein-*BmK IT_{his6}* 自剪切的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of recombinant CBD-Intein-*BmK IT_{his6}* self-cleavage in different pH

1 ~ 7: self-cleavage in pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 and 8.5, respectively.

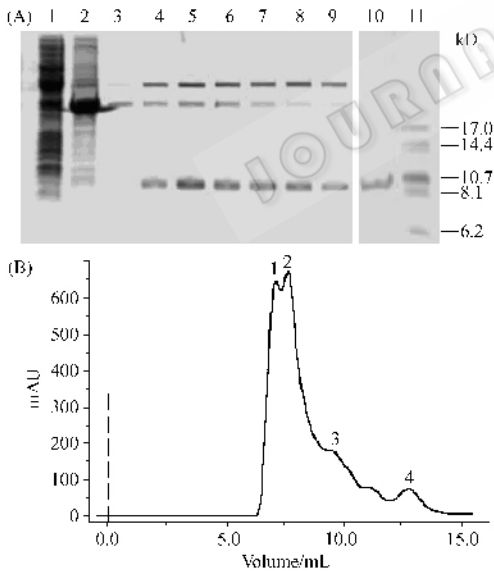


图 4 *BmK IT_{his6}* 通过 Ni-NTA 亲和层析和 Superdex 75 凝胶过滤层析的纯化图谱

Fig. 4 Purification of *BmK IT_{his6}* by Ni-NTA and Superdex 75 gel chromatography

A SDS-PAGE analysis of purification of *BmK IT_{his6}*. 1 supernatant after induction 2 the washing after intein self-cleavage 3 ~ 9: the elution after intein self-cleavage; 10: purified *BmK IT_{his6}* after Superdex 75 gel chromatography; 11: marker. B: Chromatogram of *BmK IT_{his6}* purification by Superdex 75 gel chromatography.

2.3 重组蛋白的 Western 印迹鉴定

利用 anti-His 抗体进行 Western 印迹 结果表明, 诱导表达的上清和经过 Ni-NTA 亲和纯化的样品中均检测到分子量正确的蛋白条带的存在, 而大肠杆菌 BL21(DE3) pTWIN1 细胞裂解液没有检测到任何条带 (Fig. 5), 表明已经成功表达了目的蛋白。

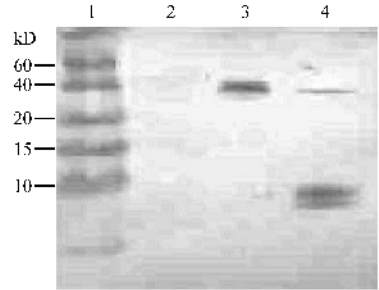


图 5 重组 *BmK IT* 的 Western blotting 鉴定

Fig. 5 Identification of recombinant *BmK IT_{his6}* by Western blotting

1: marker; 2: the extracts of *E. coli* BL21 (DE3) pTWIN1; 3: the extracts of IPTG-induced *E. coli* BL21 (DE3) pTWIN1-*BmK IT_{his6}*; 4: the purified *BmK IT_{his6}*.

2.4 *BmK IT_{his6}* 圆二色光谱的测定

蛋白质的圆二色光谱能够得出蛋白质二级结构的信息。对 *BmK IT_{his6}* 的圆二色光谱 (Fig. 6) 采用杨氏法计算发现, *BmK IT_{his6}* 含有 α -螺旋 22.9% β 折叠 27.6% β -转角 11.4% 和无规则卷曲 38.2%。这与预测的 *BmK IT* 二级结构结果相吻合。

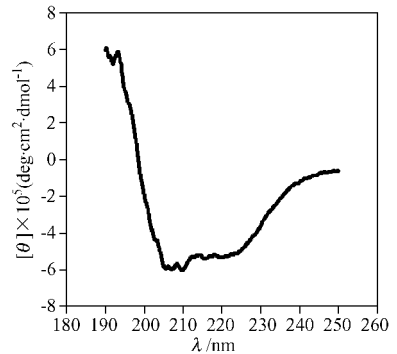


图 6 重组 *BmK IT_{his6}* 的圆二色谱

Fig. 6 Circular dichroism spectra of recombinant *BmK IT_{his6}*

2.5 重组蛋白的虫试实验

将纯化的重组蛋白拌入人工饲料进行活性检测。二龄幼虫取食 30 h 后, 对照组正常, 而实验组开始死亡, 96 h 后, 死亡率达到 70%, 随后死亡趋势停止 (Fig. 7), 可能是目的蛋白在室温暴露时间过长而导致降解。

在 96h 的实验期间内, 喂食 1.0nmol/g CBD-
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals. im. ac. cn

Intein-*BmK IT*_{his6} 融合蛋白实验组的半致死时间 LT_{50} 为 (81 ± 1) h, 而喂食 1.0 和 2.0 nmol/g *BmK IT*_{his6} 的实验组的半致死时间 LT_{50} 分别为 (67 ± 1) h 和 (47 ± 1) h。结果表明切除融合子 Intein 后的 *BmK IT*_{his6} 活性明显提高。

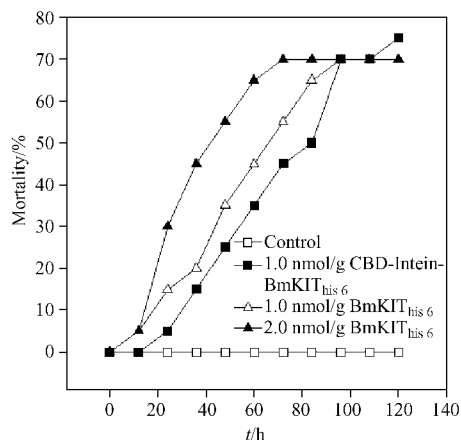


图7 喂食重组 *BmK IT* 的棉铃虫死亡率的时间变化曲线

Fig. 7 Time-mortality curves of the cotton bollworm larvae fed with recombinant *BmK IT*

3 讨论

利用基因工程方法是大量获得蝎毒素的有效途径之一。从 1989 年 Bougis^[23] 开始, 许多科研工作者尝试用大肠杆菌表达蝎毒素, 从而进行性质等方面的研究^[5-10]。本课题组曾尝试采用 pBV211、pExSecI、pGEX-6P1、pET28a 等原核表达载体进行 *BmK IT* 的表达, 不幸的是表达产物为包涵体或仅有极少量可溶表达。2005 年采用 pTWIN1 表达系统, 该系统表达的目的蛋白与一种蛋白自剪切元件(内含肽)及几丁质结合蛋白形成融合蛋白, 通过利用内含肽的可诱导自我裂解活性, 在几丁质层析柱上将目的蛋白释放出来, 具有一步快速纯化重组蛋白的优点。利用该系统我们成功获得了 CBD-Intein-*BmK IT* 的可溶性表达^[24], 但是诱导内含肽自我裂解后, 目的蛋白不能够释放出来, 仍然吸附在柱材料上。原因可能是在大肠杆菌细胞内表达的富含二硫键的 *BmK IT*, 其二硫键不能正确配对, 当在几丁质层析柱上诱导内含肽自我裂解后, 导致错误折叠或形成链间二硫键的 *BmK IT* 聚合沉淀, 被柱材料吸附不能够洗脱下来^[25]。由于利用几丁质层析柱纯化效果不理想, 我们当时采用两次阴离子柱和一次凝胶过滤层析, 获得了融合蛋白 CBD-Intein-*BmK IT*^[24]。但纯化过程比较繁琐, 而且诱导 Intein 自剪切后得

不到目的蛋白 *BmK IT*。因此, 为了提高 *BmK IT* 的得率, 本研究在 *BmK IT* 的 C 端融合 6 个组氨酸残基, 通过 pTWIN1 表达系统获得了 CBD-Intein-*BmK IT*_{his6} 融合蛋白, 该融合蛋白除了在 N 端有助溶作用的 Intein 外, C 端新加了 6 个组氨酸残基的纯化标签。将纯化与融合子的去除在 Ni-NTA 亲和柱上一步完成, 同时抑制了目的蛋白的聚合, 大大简化了纯化步骤, 使融合蛋白 CBD-Intein-*BmK IT*_{his6} 的得率达到 60% (100 mL 工程菌可获得约 16 mg)。诱导 Intein 自剪切后洗脱得到相对纯的 *BmK IT*, 100 mL 工程菌可获得约 1.8 mg *BmK IT*_{his6}。样品浓缩经过 Superdex 75 凝胶过滤层析发现, 目的蛋白有三个峰, 初步推测为四聚体、二聚体和单体。我们收集单体 *BmK IT* 进行圆二色光谱鉴定和生物学活性检测。本课题组以前利用融合蛋白 CBD-Intein-*BmK IT* 所做的活性测定中, 浓度为 50 μg/g (约 1.4 nmol/g) 时, 半致死时间 LT_{50} 为 (60 ± 2) h^[24], 因此本实验中为了便于对 CBD-Intein-*BmK IT*_{his6} 和 *BmK IT*_{his6} 的活性比较, 将两者虫试浓度统一为 1.0 nmol/g。虫试实验结果表明, C 端融合 6 个组氨酸残基的 CBD-Intein-*BmK IT*_{his6} 融合蛋白的活性与先前纯化的 CBD-Intein-*BmK IT* 活性相当, 说明 C 端引入 6 个组氨酸简化了纯化步骤, 但没有影响其活性。96 h 后, 随后死亡趋势停止未能达到 100%, 可能是目的蛋白在室温暴露 4 d, 时间过长蛋白发生降解而失去生物活性。

本研究采用 N-端融合 CBD-Intein, C-端融合 6 个组氨酸残基纯化标签的表达方式, 获得可溶性的重组蝎昆虫毒素 *BmK IT*, 并建立了简单有效的纯化方法。这为研究 *BmK IT* 的结构与功能奠定了良好的基础, 同时为其他重组蝎毒素等富含二硫键的神经毒素的原核表达提供借鉴。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Moskowicz H, Herrmann R, Jones AD, et al. depressant insect-selective toxin analog from the venom of the scorpion *Leiurus quinquestriatus hebraeus* purification and structure/function characterization. *Eur J Biochem*, 1998, 254(1): 44-49.
- [2] Gordon D. A new approach to insect-pest control combination of neurotoxins interacting with voltage sensitive sodium channels to increase selectivity and specificity. *Invert Neurosci*, 1997, 2(2-3): 103-116 (Review).
- [3] Oren DA, Froy O, Amit E, et al. An excitatory scorpion toxin with a distinctive feature: an additional alpha helix at the C terminus and its implications for interaction with insect sodium channels. *Structure*, 1998, 6(9): 1095-1103.

- [4] Li C ,Guan RJ ,Xiang Y ,*et al.* Structure of an excitatory insect-specific toxin with an analgesic effect on mammals from the scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* , 2005 **61**(1) :14 – 21 .
- [5] Zilberberg N ,Gordon D ,Pelhate M ,*et al.* Functional expression and genetic alteration of an alpha scorpion neurotoxin. *Biochemistry* , 1996 **35**(31) :10215 – 10222 .
- [6] Turkov M ,Rashi S ,Noam Z ,*et al.* *In vitro* folding and functional analysis of an anti-insect selective scorpion depressant neurotoxin produced in *Escherichia coli* . *Protein Expr Purif* ,1997 **10**(1) :123 – 131 .
- [7] Jiang G ,Xu Y ,Zhu X ,*et al.* Prokaryotically expressed *Buthus martensii* Karsch insect depressant toxin has insecticidal effects. *Toxicon* 2001 **39**(4) 469 – 476 .
- [8] Legros C ,Ceard B ,Vacher H ,*et al.* Expression of the standard scorpion alpha-toxin AaH II and AaH II mutants leading to the identification of some key bioactive elements. *Biochim Biophys Acta* 2005 **1723**(1 – 3) 91 – 99 . Epub 2005 Jan 29 .
- [9] Li C ,Liu W ,Bossmans F ,*et al.* Expression ,renaturation and functional analysis of an excitatory insect-specific toxin from scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Protein Pept Lett* ,2005 **12**(7) :635 – 638 .
- [10] Nikkha M ,Naderi-Manesh H ,Sarbolouki MN ,*et al.* Efficient *in vitro* refolding and characterization of a new peptide from the scorpion *Buthus saulcyi* venom produced in *Escherichia coli* . *Protein Pept Lett* 2006 **13**(7) 659 – 664 .
- [11] Martin-Eauclaire MF ,Sogaard M ,Ramos C ,*et al.* Production of active insect-specific scorpion neurotoxin in yeast. *Eur J Biochem* , 1994 **223**(2) 637 – 645 .
- [12] Dee A ,Belagaje RM ,Ward K ,*et al.* Expression and secretion of a functional scorpion insecticidal toxin in cultured mouse cells. *Biotechnology (NY)* ,1990 **8**(4) 339 – 342 .
- [13] Chejanovsky N ,Zilberberg N ,Rivkin H ,*et al.* Functional expression of an alpha anti-insect scorpion neurotoxin in insect cells and lepidopterous larvae. *FEBS Lett* ,1995 **376**(3) :181 – 184 .
- [14] Liu Z ,Yang G ,Li B ,*et al.* Cloning ,co-expression with an amidating enzyme ,and activity of the scorpion toxin *BmK ITaI* cDNA in insect cells. *Mol Biotechnol* 2003 **24**(1) 21 – 26 .
- [15] Yao B (姚斌) ,Fan YL (范云六) ,Zeng Q (曾勤) . Insect-resistant tobacco plants expressing insect-specific neurotoxin AaIT. *Chin J Biotechnol (生物工程学报)* ,1996 **12**(2) 67 – 72 .
- [16] Wu NF (伍宁丰) ,Sun Q (孙芹) ,Yao B (姚斌) ,*et al.* Insect-resistant transgenic poplar expressing AaIT gene. *Chin J Biotechnol (生物工程学报)* 2000 **16**(2) :129 – 133 .
- [17] Wang J ,Chen Z ,Du J ,*et al.* Novel insect resistance in *Brassica napus* developed by transformation of chitinase and scorpion toxin genes. *Plant Cell Rep* 2005 **24**(9) 549 – 555 .
- [18] Stewart LM ,Hirst M ,Lopez Ferber M ,*et al.* Construction of an improved baculovirus insecticide containing an insect-specific toxin gene. *Nature* ,1991 **353**(6330) 85 – 88 .
- [19] Regev A ,Rivkin H ,Inceoglu B ,*et al.* Further enhancement of baculovirus insecticidal efficacy with scorpion toxins that interact cooperatively. *FEBS Lett* 2003 **537**(1 – 3) :106 – 110 .
- [20] Ji YH ,Mansuelle P ,Xu K ,*et al.* Amino acid sequence of an excitatory insect-selective toxin (*BmK IT*) from venom of the scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Sci China B* ,1994 **37**(1) 42 – 49 .
- [21] Liang AH (梁爱华) ,Li XL (李晓玲) ,Su ZG (苏智广) ,*et al.* Cloning and sequencing of an insect-specific neurotoxin *BmK IT* cDNA from *Buthus martensii* Karsch. *High Tech Lett (高技术通报)* ,1999 **9** :12 – 15 .
- [22] Sambrook J ,Russell D . Molecular Cloning :A Laboratory Manual 3rd ed. New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001 .
- [23] Bougis PE ,Rochat H ,Smith LA . Precursors of *Androctonus australis* scorpion neurotoxins . Structures of precursors ,processing outcomes , and expression of a functional recombinant toxin II. *J Biol Chem* , 1989 **264**(32) :19259 – 19265 .
- [24] Hao CJ ,Xu CG ,Wang W ,*et al.* Expression of an insect excitatory toxin ,*BmK IT* ,from the scorpion ,*Buthus martensii* Karsch ,and its biological activity. *Biotech Lett* 2005 **27** :1929 – 1934 .
- [25] Nomie Y ,Ristriani T ,Laurent C ,*et al.* Formation of soluble inclusion bodies by hpv e6 oncoprotein fused to maltose-binding protein. *Protein Expr Purif* 2001 **23**(1) 22 – 32 .