

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104946677 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 30

(21) 申请号 201510158077. 6

(22) 申请日 2015. 04. 07

(71) 申请人 上海大学

地址 200444 上海市宝山区上大路 99 号

(72) 发明人 吉永华 施健 陶杰 祝艳

(74) 专利代理机构 上海上大专利事务所（普通  
合伙） 31205

代理人 陆聪明

(51) Int. Cl.

C12N 15/63(2006. 01)

C12N 15/66(2006. 01)

权利要求书2页 说明书7页

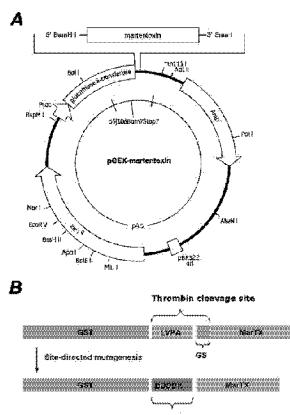
序列表2页 附图5页

(54) 发明名称

BK 通道的特异性配体的重组质粒及其重组表达方法

(57) 摘要

本发明涉及一种 BK 通道的特异性配体的重组质粒及其重组表达方法，该配体质粒为 SEQ ID NO:1 所示的碱基序列。本发明提供了体外表达载体 pGEX-4T-3 的构建以及 MarTX 体外表达方法的技术参数。本发明所得到的短链蝎毒素 MarTX 在 pGEX-4T-3 系统中被成功表达，其分子量和生物活性与天然 MarTX 几乎吻合；重组 MarTX 可选择性地阻断 BK 通道 ( $\alpha + \beta 4$ )，部分抑制 mKv1.3 通道的电流，但对 hKv4.2 和 hKv3.1a 没有明显的调节效应。



1. 一种 BK 通道的特异性配体的重组表达方法, 其特征在于该方法的具体步骤为:

a. 基于 MarTX 的 cDNA 序列, 涉及两对引物, MarTX- 正向引物为: 5' -TTCGGATCCTTGGACTCATAGA-3', 其中包含一个 BamH I 的酶切位点; MarTX- 反向引物为: 5' -CTTCCCGGTTAACAGTAGCAT-3', 其中包含一个 Sma I 的酶切位点; 构建载体质粒 pGEX-4T-3-martentoxin;

b. 根据设计 PCR 点突变的引物序列:

其正向引物为: 5' -GATGACGATGACAAGTTGGACTCATAGACGTAAATGTTTG-3', 其中包含小肠激酶识别位点的 DNA 序列;

反向引物是凝血酶酶切位点的 DNA 序列, 该序列为: 5' -GGATCCACGCGGAACCAGATC-3', 其中包含一个 BamH I 位点; 以该 pGEX-4T-3-martentoxin 质粒为模板进行反向 PCR, 所得产物经纯化回收得该 DNA 回收产物; 该反向 PCR 的反应体系为: pGEX-4T-3-martentoxin 1μl, 正向引物 1μl, 反向引物 1μl, 2.5mmol/L dNTPs 5μl, 10XPCR buffer 5μl, 25mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2.8μl, 2.5U/μl KOD 1μl, ddH<sub>2</sub>O 33.2μl;

c. 将步骤 b 所得 DNA 纯化回收并且将其回收产物磷酸化, 并与 T4 连接酶连接;

d. 将步骤 c 所得产物转化 E. coli/DH5 $\alpha$  感受态细胞, 得到了完整的表达质粒 pGEX-4T-3-MarTX;

e. 将步骤 d 所得表达质粒 pGEX-4T-3-MarTX 转化至大肠杆菌菌株中, 以诱导毒素蛋白的表达, 在冰浴下超声破碎细胞, 得裂解物;

f. 将步骤 e 所得裂解物分离纯化, 超滤管脱盐后, 小肠激酶酶切并在室温孵育 20 h, 得酶切产物;

g. 将步骤 f 所得酶切产物经纯化后真空冷冻干燥, 使用含有 50 mM DTT 的 Tris- 碱缓冲液(pH 8.0)还原, 得重组产物; 该重组产物在包含 1 mM 还原型谷胱甘肽(GSH)和 0.1 mM 氧化型谷胱甘肽(GSSG)的 0.05 M Tris- 碱缓冲液(pH 8.0, 其中有 2 M 盐酸胍)中重折叠, 得到 BK 通道的特异性配体的重组表达质粒。

2. 根据权利要求 1 所述的方法, 其特征在于所述的步骤 c 中的 DNA 纯化回收的具体步骤为:

①柱平衡步骤: 向吸附柱 CA2 中, (吸附柱放入收集管中) 加入 500 μL 平衡液 BL, 12,000 rpm 离心一分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中;

②将单一的目的 DNA 条带从琼脂糖凝胶中切下(尽量切除多余部分) 放入干净的离心管中, 称取重量;

③向胶块中加入溶胶液 PN: 如凝胶重为 0.1g, 溶胶液为 100 μL, 依此类推; 50°C 水浴放置 10 分钟, 其间不断温和地上下翻转离心管, 以确保胶块充分溶解;

④将上一步所得溶液加入一个吸附柱 CA2 中(吸附柱放入收集管中), 室温放置 2 分钟, 12,000 rpm 离心 60 秒, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱 CA2 放入收集管中;

⑤向吸附柱 CA2 中加入 700 μL 漂洗液 PW, 12,000 rpm 离心 60 秒, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱 CA2 放入收集管中;

⑥向吸附柱 CA2 中加入 500 μL 漂洗液 PW, 12,000 rpm 离心 60 秒, 倒掉废液;

⑦将吸附柱 CA2 放回收集管中, 12,000 rpm 离心 2 分钟, 尽量除尽漂洗液;

将吸附柱 CA2 开盖至于室温放置数分钟, 彻底地晾干, 以防止残留的漂洗液影响下一

步的实验；

⑧将吸附柱 CA2 放到一个干净离心管中,向吸附膜中间位置悬空滴加适量洗脱缓冲液 EB,洗脱缓冲液 EB 应置于 65~70° C水浴预热,室温放置 2 分钟;12,000 rpm 离心 2 分钟收集 DNA 溶液。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于所述的步骤 d 的转化 E. coli/DH5 $\alpha$  感受态细胞,得到了完整的表达质粒 pGEX-4T-3-MarTX 的具体步骤为:10  $\mu$ L 连接产物与 100  $\mu$ L 的感受态细胞温和混匀,插入冰中放置 30 分钟;42°C热击 90 秒,然后快速插入冰中 3 分钟;加入 400  $\mu$ L 的不含氨苄青霉素的液体 LB 培养基,180 rpm,37°C培养 45 分钟;吸取 100  $\mu$ L 涂板,37°C正置 15 分钟,待完全吸收后,倒置培养 14~16 小时,

挑取单菌落,接种于 3 mL 含有氨苄青霉素(100  $\mu$ g/mL)的 LB 培养基中,37°C振摇 16~18 h;利用普通质粒小提试剂盒小量抽提质粒,阳性重组子送测序;从而得到了完整的表达质粒 pGEX-4T-3-MarTX。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于所述的步骤 e 的具体方法为:将步骤 b 所述的表达质粒 pGEX-4T-3-MarTX 被转化至大肠杆菌菌株 BL21 (DE3) 中,菌株细胞在含有 0.1 mg/mL 氨苄青霉素的 Luria-Bertani (LB) 培养基(体积为 1 L)中生长,培养温度为 37°C;当菌液  $OD_{600}$  值达到 0.4~0.6 时,加入终浓度为 0.5 mM 的 Isopropyl- $\beta$ -d-thiogalactoside (IPTG) 以诱导毒素蛋白的表达,大肠杆菌细胞在 28°C持续生长 4 小时;以 5000 g 转速离心 10 min 以收集细胞,重悬于 70 mL 的 1× 磷酸盐缓冲液(PBS,137 mM NaCl, 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.7 mM KCl, 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4);冰浴并超声破碎细胞(4 bursts/min),持续 20 min,得裂解物。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于所述的步骤 f 的具体步骤为:将步骤 e 所得裂解物在 4 °C下,以 12,000 g 的转速离心 15 min,上清液使用 0.45 的滤膜过滤,通过含有谷胱甘肽 - 琼脂糖 4B 填料颗粒的 Econo- 层析柱亲和层析,流速控制在 0.03 mL/min;由事先预冷的 30 mL PBS 缓冲液洗脱,流速为 0.3 mL/min;GST-rMarTX 融合蛋白用 10 mM 谷胱甘肽洗脱缓冲液从亲和柱填料上洗脱;GST-rMarTX 通过截留分子量为 10 kDa 超滤管脱盐,加入 10 U/mL 的小肠激酶酶切并在室温孵育 20 h,得酶切产物。

## BK 通道的特异性配体的重组质粒及其重组表达方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种 BK 通道的特异性配体的重组质粒的重组表达方法。

### 背景技术

[0002] 在众多离子通道中,钾离子通道是分布最广泛、亚型最多、结构最复杂的一类离子通道,几乎存在大多数的生物中。钾离子通道控制了广泛的生物功能,其对于动作电位在可兴奋性细胞中的产生和传播有着关键性作用,其激活和失活特性与动作电位的发放模式有着密切关系。钾离子通道的特异性配体在天然产物中的含量微乎其微,难以通过传统的分离纯化手段获得;且由于其分子量小的限制,通过常规体外表达方式,也难以获得有活性的多肽。

[0003] 目前,虽然已有超过 10 种短链毒素从东亚短钳蝎(*Buthus martensi* Karsch)毒中被分离提取出来,然而无一被成功地体外表达,其中就包括 BK 通道的特异性配体 Martentoxin。Martentoxin (MarTX) 是一种特异性作用于 BK 通道的短链肽毒素,由 37 个氨基酸残基构成(分子量 4060 Da),隶属于  $\alpha$ -KTX 16 亚家族,亦被称为 BmTX3B。因此,通过体外表达途径获得天然产物中稀少的 Martentoxin,对于充分地解析 BK 通道的受体位点,及通道与配体相互作用的模式具有重要的推进作用。但仅通过常规的体外表达方法获得重组 Martentoxin (rMartentoxin),其产量和活性均不高。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于克服技术中存在的缺陷,提供一种采用分子生物手段针对性地修改体外表达载体 pGEX-4T-3,并优化体外表达方法,从而获得重组的 rMarTX 的方法,该方法具有良好的产量和毒素活性。

[0005] 本发明利用膜片钳检测了 rMarTX 对 4 种钾通道的药理学效应,其对 4 种钾通道的药理学效应和野生型几乎吻合。

[0006] 曾有报告提示,重组毒素容易在诸如 BL21 及其衍生物 BL21 (DE3) 菌株等原核细胞表达系统中形成包涵体,降低了其表达产物的活性和得率。在本研究中, GST-rMarTX 融合蛋白始终溶于上清液中,并没有形成包涵体。这或许是由于融合蛋白本身性质与超声破菌的实验条件决定的;冷冻干燥后对 rMarTX 的重折叠及 HPLC 的检测也保证了毒素的结构准确和得率。经电生理记录验证,1  $\mu$ M 的 rMarTX 可有效地抑制 BK 通道的电流,其 IC<sub>50</sub> 和 Hill 系数与天然毒素十分相近。由此表明,经 BL21(DE3) 系统表达具有生物活性的 rMarTX 的途径是可行的。

[0007] 为了提高毒素的产量,除了 pGEX-4T-3 载体外,我们还尝试了以下几种异源表达系统(pET32a 和 pGEX-KG)。遗憾的是,这些系统的产率不及 pGEX-4T-3(表 1),最后被放弃采用。

[0008] 表 1 各表达载体和大肠杆菌菌株 rMarTX 的得率

Vector	Optimal Host Bacteria	LB volumes	Yield
pGEX-4T-3	BL21 (DE3)	1 L	0.61-1.31 mg
pGEX-4T-3	Rosetta	1 L	0.15 mg
pGEX-KG	BL21-Gold	1 L	42 μg
pET32a	BL21-Gold	1 L	N/A

为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

一种 BK 通道的特异性配体的重组表达方法,其特征在于该方法的具体步骤为:

a. 基于 MarTX 的 cDNA 序列,涉及两对引物,MarTX- 正向引物为:5' -TTCGGATCCTTGACTCATAGA-3',其中包含一个 BamH I 的酶切位点;MarTX- 反向引物为:5' -CTTCCCGGGTTAACAGTAGCAT-3',其中包含一个 Sma I 的酶切位点;构建载体质粒 pGEX-4T-3-martentoxin;

b. 根据设计 PCR 点突变的引物序列:

其正向引物为:5' -GATGACGATGACAAGTTGGACTCATAGACGTAAATGTTTG-3',其中包含小肠激酶识别位点的 DNA 序列;

反向引物是凝血酶酶切位点的 DNA 序列,该序列为:5' -GGATCCACGCGAACAGATC-3',其中包含一个 BamH I 位点;以该 pGEX-4T-3-martentoxin 质粒为模板进行反向 PCR,所得产物经纯化回收得该 DNA 回收产物;该反向 PCR 的反应体系为:pGEX-4T-3-martentoxin 1μl, 正向引物 1μl, 反向引物 1μl, 2.5mmol/L dNTPs 5μl, 10XPCR buffer 5μl, 25mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2.8μl, 2.5U/μl KOD 1μl, ddH<sub>2</sub>O 33.2μl;

c. 将步骤 b 所得 DNA 纯化回收并且将其回收产物磷酸化,并与 T4 连接酶连接;

d. 将步骤 c 所得产物转化 E.coli/DH5α 感受态细胞,得到了完整的表达质粒 pGEX-4T-3-MarTX;

e. 将步骤 d 所得表达质粒 pGEX-4T-3-MarTX 转化至大肠杆菌菌株中,以诱导毒素蛋白的表达,在冰浴下超声破碎细胞,得裂解物;

f. 将步骤 e 所得裂解物分离纯化,超滤管脱盐后,小肠激酶酶切并在室温孵育 20 h,得酶切产物;

g. 将步骤 f 所得酶切产物经纯化后真空冷冻干燥,使用含有 50 mM DTT 的 Tris- 碱缓冲液(pH 8.0)还原,得重组产物;该重组产物在包含 1 mM 还原型谷胱甘肽(GSH)和 0.1 mM 氧化型谷胱甘肽(GSSG)的 0.05 M Tris- 碱缓冲液(pH 8.0,其中有 2 M 盐酸胍)中重折叠,得到 BK 通道的特异性配体的重组表达质粒。

[0009] 该重组表达质粒的序列为 SEQ ID NO:1 所示的碱基序列。

[0010] 上述的步骤 c 中的 DNA 纯化回收的具体步骤为:

①柱平衡步骤:向吸附柱 CA2 中,(吸附柱放入收集管中)加入 500 μL 平衡液 BL,12,000 rpm 离心一分钟,倒掉收集管中的废液,将吸附柱重新放回收集管中;

②将单一的目的 DNA 条带从琼脂糖凝胶中切下(尽量切除多余部分)放入干净的离心管中,称取重量;

③向胶块中加入溶胶液 PN:如凝胶重为 0.1g,溶胶液为 100 μL,依此类推;50℃水浴

放置 10 分钟,其间不断温和地上下翻转离心管,以确保胶块充分溶解;

④将上一步所得溶液加入一个吸附柱 CA2 中(吸附柱放入收集管中),室温放置 2 分钟,12,000 rpm 离心 60 秒,倒掉收集管中的废液,将吸附柱 CA2 放入收集管中;

⑤向吸附柱 CA2 中加入 700  $\mu\text{L}$  漂洗液 PW,12,000 rpm 离心 60 秒,倒掉收集管中的废液,将吸附柱 CA2 放入收集管中;

⑥向吸附柱 CA2 中加入 500  $\mu\text{L}$  漂洗液 PW,12,000 rpm 离心 60 秒,倒掉废液;

⑦将吸附柱 CA2 放回收集管中,12,000 rpm 离心 2 分钟,尽量除尽漂洗液。将吸附柱 CA2 开盖至于室温放置数分钟,彻底地晾干,以防止残留的漂洗液影响下一步的实验;

⑧将吸附柱 CA2 放到一个干净离心管中,向吸附膜中间位置悬空滴加适量洗脱缓冲液 EB,洗脱缓冲液 EB 应置于 65~70°C 水浴预热,室温放置 2 分钟;12,000 rpm 离心 2 分钟收集 DNA 溶液。

[0011] 上述的步骤 d 的转化 E. coli/DH5 $\alpha$  感受态细胞,得到了完整的表达质粒 pGEX-4T-3-MarTX 的具体步骤为:10  $\mu\text{L}$  连接产物与 100  $\mu\text{L}$  的感受态细胞温和混匀,插入冰中放置 30 分钟;42°C 热击 90 秒,然后快速插入冰中 3 分钟;加入 400  $\mu\text{L}$  的不含氨苄青霉素的液体 LB 培养基,180 rpm,37°C 培养 45 分钟;吸取 100  $\mu\text{L}$  涂板,37°C 正置 15 分钟,待完全吸收后,倒置培养 14~16 小时。挑取单菌落,接种于 3 mL 含有氨苄青霉素 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的 LB 培养基中,37°C 振摇 16~18 h;利用普通质粒小提试剂盒少量抽提质粒,阳性重组子送测序;从而得到了完整的表达质粒 pGEX-4T-3-MarTX。

[0012] 上述的步骤 e 的具体方法为:将步骤 b 所述的表达质粒 pGEX-4T-3-MarTX 被转化至大肠杆菌菌株 BL21 (DE3) 中,菌株细胞在含有 0.1 mg/mL 氨苄青霉素的 Luria-Bertani (LB) 培养基(体积为 1 L)中生长,培养温度为 37°C;当菌液  $O_{\text{D}600}$  值达到 0.4~0.6 时,加入终浓度为 0.5 mM 的 Isopropyl- $\beta$ -d-thiogalactoside (IPTG) 以诱导毒素蛋白的表达,大肠杆菌细胞在 28°C 持续生长 4 小时;以 5000 g 转速离心 10 min 以收集细胞,重悬于 70 mL 的 1× 磷酸盐缓冲液(PBS,137 mM NaCl, 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.7 mM KCl, 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4);冰浴并超声破碎细胞(4 bursts/min),持续 20 min,得裂解物。

[0013] 上述的步骤 f 的具体步骤为:将步骤 e 所得裂解物在 4 °C 下,以 12,000 g 的转速离心 15 min,上清液使用 0.45 的滤膜过滤,通过含有谷胱甘肽 - 琼脂糖 4B 填料颗粒的 Econo- 层析柱亲和层析,流速控制在 0.03 mL/min;由事先预冷的 30 mL PBS 缓冲液洗脱,流速为 0.3 mL/min;GST-rMarTX 融合蛋白用 10 mM 谷胱甘肽洗脱缓冲液从亲和柱填料上洗脱;GST-rMarTX 通过截留分子量为 10 kDa 超滤管脱盐,加入 10 U/mL 的小肠激酶酶切并在室温孵育 20 h,得酶切产物。

[0014] 在构建载体质粒 pGEX-4T-3-martentoxin 的表达系统中,6 个多余的碱基对出现在凝血酶酶切位点和 MarTX 的 cDNA 序列之间。这将会导致表达产物 GST-rMarTX 被凝血酶酶切后 rMarTX 的 N 端出现多余的 2 个氨基酸残基。在本专利的重组表达方法中,通过创新性地引入小肠激酶酶切位点,致使 N 端两个额外的氨基酸被移除,其结果易化了 rMarTX 对 BK 通道的阻断效应。其特征步骤为:通过使用 KOD 突变试剂盒所描述的点突变方法可将多余的碱基对去除。PCR 点突变的正向引物为(5'-GATGACGATGACAAGTTGGACTCATAGACGTAAAATGTTTG-3')包含小肠激酶识别位点的 DNA 序列(下划线),反向引物是凝血酶酶切位点的 DNA 序列(5' -GGATCCACGCGAACAGATC-3'),其中包含一个 BamH I 位点(下划线)。从而使

得本发明的质粒在分子改造过的 pGEX-4T-3 系统中被成功表达,之后的功能鉴定其分子量和生物活性与天然 MarTX 几乎吻合。

[0015] 目前,超过 10 种短链毒素从东亚短钳蝎毒中被分离提取出来,然而无一被成功地体外表达,其中就包括 BK 通道的特异性配体 Martentoxin。仅通过常规的体外表达方法获得重组 Martentoxin (rMartentoxin),其产量和活性均不高。本发明通过针对性地修改体外表达载体 pGEX-4T-3,优化常规的体外表达方法,从而获得重组的 rMarTX,该方法所得产物具有良好的产量和毒素活性。

## 附图说明

[0016] 图 1 为 pGEX-4T-3-rMarTX 表达系统的构建。(A) MarTX 的基因由 PCR 扩增通过 BamH I/Sma 双酶切位点连接入载体;(B) 原始表达载体, pGEX-4T-3-rMarTX 包含凝血酶 (thrombin) 的酶切位点(上)。突变后的载体, pGEX-4T-3-rMarTX 包含小肠激酶酶切位点(下)。

[0017] 图 2 为 SDS-PAGE 分析。泳道 M,蛋白分子量 Markers ;泳道 1,未诱导的细胞样品;泳道 2,经 IPTG 诱导的细胞样品;泳道 3,提取自诱导细胞的所有可溶性蛋白;泳道 4,亲和层析后洗脱产物(融合蛋白 GST-rMarTX);泳道 5,脱盐后的融合蛋白;泳道 6,小肠激酶酶切产物(箭头处的条带为目的产物 rMarTX)。

[0018] 图 3 为 rMarTX 的 RP-HPLC 色谱和质谱分析。(A) 天然 MarTX 的 RP-HPLC 色谱图,使用 C18 柱以 5% -95% 乙腈(包含 0.1% 三氟乙酸 TFA)线性梯度分离纯化产物,控制流速为 1 mL/min,并在 230 nm 波长下检测样品吸收峰;(B)rMarTX 在相同条件下的 RP-HPLC 色谱。(C) rMarTX 的质谱分析, rMarTX 理论分子量应为 4060 Da,实际测得 rMarTX 的分子量为 4059. 06 Da。

[0019] 图 4 为 rMarTX 对 HEK293T 细胞中神经型 BK 通道( $\alpha + \beta 4$ )的抑制效应。(A)施加 1  $\mu$ M rMarTX 前后,表达有 BK 通道( $\alpha + \beta 4$ )的 HEK293T 细胞的全细胞电流。钳制电位被设置在 -70 mV,电流由 +100 mV 的脉冲激发,电极内自由钙浓度为 300 nM;(B) rMarTX 抑制 BK 通道电流的剂量依懒性曲线通过 Hill 方程拟合,  $IC_{50}=186.66 \pm 0.04$  nM, Hill 系数为  $2.41 \pm 0.92$  ( $n=5-6$ )。

[0020] 图 5 为 rMarTX 对 hKv3.1a、hKv4.2 和 mKv1.3 通道的药理作用。(A) 施加 10  $\mu$ M rMarTX 前后,表达有 hKv3.1a 通道的 HEK293T 细胞的全细胞电流。钳制电位被设置在 -100 mV,电流由 +40 mV 的脉冲激发;(B) 施加 10  $\mu$ M rMarTX 前后,表达有 hKv4.2 通道的 HEK293T 细胞的全细胞电流;(C) 施加 1  $\mu$ M rMarTX 前后,表达有 mKv1.3 通道的 HEK293T 细胞的全细胞电流;(D) 统计分析 rMarTX 对 hKv3.1a 的药理作用,浓度分别为 100 nM ( $I_f=1.03 \pm 0.04$ ,  $n=9$ ,  $p>0.05$ ), 1  $\mu$ M ( $I_f=0.99 \pm 0.04$ ,  $n=9$ ,  $p>0.05$ ), 10  $\mu$ M ( $I_f=0.95 \pm 0.04$ ,  $n=3$ ,  $p>0.05$ );(E) 统计分析 rMarTX 对 hKv4.2 的药理作用,浓度分别为 100 nM ( $I_f=0.87 \pm 0.16$ ,  $n=5$ ,  $p>0.05$ ), 1  $\mu$ M ( $I_f=0.88 \pm 0.09$ ,  $n=5$ ,  $p>0.05$ ) 和 10  $\mu$ M ( $I_f=0.92 \pm 0.06$ ,  $n=9$ ,  $p>0.05$ );(F) 统计分析 rMarTX 对 mKv1.3 的药理作用,浓度分别为 100 nM ( $I_f=0.88 \pm 0.02$ ,  $n=10$ ,  $p<0.001$ ), 1  $\mu$ M ( $I_f=0.77 \pm 0.05$ ,  $n=8$ ,  $p<0.001$ ), 10  $\mu$ M ( $I_f=0.71 \pm 0.04$ ,  $n=6$ ,  $p<0.001$ )。

## 具体实施方式

[0021] 下面将通过实施例对本发明作进一步的描述,这些描述并不是要对本发明作进一步的限定。本领域的技术人员应该理解,对本发明内容的技术特征所做的等同替换,或相应的改进,仍属于本发明的保护范围之内。

### [0022] 实施例 1 :pGEX-4T-3-Martentoxin 质粒的构建

基于 MarTX 的 cDNA 序列(GenBank 号 AF534113.1),两对引物被设计用以扩增 MarTX 的编码序列及引入载体 pGEX-4T-3 上的酶切位点。MarTX- 正向引物(5' -TTCGGATCCTTT GGACTCATAGA-3'),其中包含一个 BamH I 的酶切位点(下划线);MarTX- 反向引物(5' -CT TCCCGGGTTAACAGTAGCAT-3')包含一个 Sma I 的酶切位点(下划线)。MarTX 的 cDNA 序列被插入在 pGEX-4T-3 的 BamH I 和 Sma I 两酶切位点间,从而得到了完整的表达质粒 pGEX-4T-3-MarTX,如图 1-A 所示。

[0023] 在该表达系统中,6 个多余的碱基对出现在凝血酶酶切位点和 MarTX 的 cDNA 序列之间。这将会导致表达产物 GST-rMarTX 被凝血酶酶切后 rMarTX 的 N 端出现多余的 2 个氨基酸残基(GS,图 1B)。通过使用 KOD 突变试剂盒(Toyobo 公司,日本)所描述的点突变方法可将多余的碱基对去除。PCR 点突变的正向引物为(5' -GATGACGATGACAAGTTGGACTCATAGAC GTAAAATGTTTG-3')包含小肠激酶识别位点的 DNA 序列(下划线),反向引物是凝血酶酶切位点的 DNA 序列(5' -GGATCCACGCGAACCAGATC-3'),其中包含一个 BamH I 位点(下划线)。所有构建的质粒序列都经过测序验证(Lifetechnologies 公司,中国)。

### [0024] 实施例 2 :rMarTX 的体外表达与纯化

表达质粒 pGEX-4T-3-MarTX 被转化至大肠杆菌菌株 BL21(DE3)中,菌株细胞在含有 0.1 mg/mL 氨苄青霉素的 Luria-Bertani (LB) 培养基(体积为 1 L)中生长,培养温度为 37 ° C。当菌液 OD<sub>600</sub> 值达到 0.4-0.6 时,加入终浓度为 0.5 mM 的 Isopropyl-β-d-thiogalactoside (IPTG) 以诱导毒素蛋白的表达。大肠杆菌细胞在 28 ° C 持续生长 4 小时。培养后,以 5000 g 转速离心 10 min 以收集细胞,重悬于 70 mL 的 1× 磷酸盐缓冲液(PBS, 137 mM NaCl, 4.3 mM Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>, 2.7 mM KC1, 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4)。冰浴并超声破碎细胞(4 bursts/min),持续 20 min。将裂解物在 4 ° C 下,以 12,000 g 的转速离心 15 min。上清液使用 0.45 的滤膜过滤,通过含有谷胱甘肽 - 琼脂糖 4B 填料颗粒的 Econo- 层析柱(Bio-Rad 公司,美国)亲和层析,流速控制在 0.03 mL/min。后由事先预冷的 30 mL PBS 缓冲液洗脱,流速为 0.3 mL/min。GST-rMarTX 融合蛋白用 10 mM 谷胱甘肽洗脱缓冲液(GEB,Sigma-Aldrich 公司,美国)从亲和柱填料上洗脱。GST-rMarTX 通过截留分子量为 10 kDa 超滤管(Millipore 公司, USA)脱盐,加入 10 U/mL 的小肠激酶酶切并在室温孵育 20 h。酶切产物经过 Sephadex G-50 柱(GE 公司,美国)去除 GST 标签,控制流速为 15 mL/h。洗脱液的峰值通过波长为 215nm 的紫外分光光度计检测。回收产物选用包含 C18 柱(Agilent Eclipse XDB-C 18, 4.6 mm × 150 mm, Agilent 公司,美国)的反相 HPLC(Waters 600E-2487, Waters Milford 公司,美国)纯化,经由 5%-95% 乙腈(含 0.1% 三氟乙酸 (TFA))的线性梯度分离,控制流速为 1 mL/min 持续 60 min,峰值通过 230 nm 波长的紫外分光光度计检测吸收峰及其保留时间。纯化产物经过真空冷冻干燥后,使用含有 50 mM DTT 的 Tris- 碱缓冲液(pH 8.0)还原。重组产物在包含 1 mM 还原型谷胱甘肽(GSH)和 0.1 mM 氧化型谷胱甘肽(GSSG)的 0.05 M Tris- 碱缓冲液(pH 8.0,其中有 2 M 盐酸胍)中重折叠。HPLC 系统用于分离纯化折叠正确的表达产

物。以上所有洗脱和分离的蛋白产物都经过 15% SDS-PAGE 分析。正确折叠的纯化产物通过基质辅助激光解析电离 - 飞行时间质谱仪检测其分子量(UltraflexBruker Daltonics 公司,美国)。rMarTX 的得率通过分析天平称量(Mettler-Toledo 公司,瑞士联邦)。

[0025] 如图 2 中显示了表达和分离提取 rMarTX 各步骤中洗脱产物的凝胶电泳分析。比较未经诱导的细胞样品(泳道 1),经 IPTG 诱导的细胞样品(泳道 2)中出现了一条新的蛋白条带。该条带的分子量约为 30 kDa,与 GST-rMarTX 融合蛋白的理论分子量一致。超破碎细胞后的细胞上清液(泳道 3)经过装有谷胱甘肽 - 琼脂糖 4B 凝胶的亲和层析色谱柱纯化,这就使得 30 kDa 产物(GST-rMarTX 融合蛋白)得到了初步的分离纯化,在电泳中的泳道 4 仅出现 30 kDa 的条带。经过 10 kDa 超滤脱盐后的分离物被小肠激酶酶切。泳道 5 显示了酶切产生两条带,分别为 26 kDa 大小的和小于 14 kDa 的条带,分别代表 GST 标签和目的产物 rMarTX。

[0026] 酶切后的 rMarTX 通过反相 HPLC 纯化。天然的 MarTX 样品作为对照首先被注射入 C18 柱。如图 3-A 所示,对照的峰值出现在 17 min。随后注入异质表达的 rMarTX,其峰值也出现在 17 min,如图 3-B 所示。收集保留时间与对照相近的 rMarTX,真空干燥,准备做下一步分析。

[0027] 图 3-C 显示了对反相 HPLC 纯化产物的质谱分析。结果显示 rMarTX 的分子量为 4059.06 Da,与天然 MarTX 的理论分子量(4060 Da)相差不到 1 Da。体外表达重组多肽的得率达到 0.61–1.31 mg/1 L LB 培养基。

[0028] 实例 3 :重组 rMarTX 的电生理检测

### 3.1 电生理实验的溶液配制

在膜片钳实验中,BK 通道的细胞外液(mM):NaCl 135, KCl 5, MgCl<sub>2</sub> 1.2, CdCl<sub>2</sub> 2.5, HEPES 5, glucose 10(以 NaOH 调节 pH 至 7.4);电极内液(mM):NaCl 10, KCl 117, MgSO<sub>4</sub> 2, HEPES 10, MgATP 2, EGTA 1(以 KOH 调节 pH 至 7.2)。

[0029] mKv1.3 和 hKv3.1a 通道的细胞外液(mM):NaCl 135, KCl 5, MgCl<sub>2</sub> 1, CaCl<sub>2</sub> 1.8, HEPES 10, glucose 10(由 NaOH 调整 pH 至 7.4);hKv4.2 通道的细胞外液(mM):NaCl 125, KCl 2, MgCl<sub>2</sub> 1, glucose 10, HEPES 10, TEA 20(由 NaOH 调整 pH 至 7.4)。mKv1.3、hKv3.1a 和 hKv4.2 的电极内液(mM):KCl 130, MgCl<sub>2</sub> 0.5, MgATP 2, EGTA 10, HEPES 10(由 KOH 调整 pH 至 7.3)。

[0030] 3.2 瞬时转染

BK 通道、mKv1.3、hKv3.1a 和 hKv4.2 通道均是通过瞬时转染在 HEK293T 细胞中表达。瞬时转染采用 24 孔板体系,转染前一天,在 500 μL 培养基中接种 0.5–2×10<sup>5</sup> 细胞,不添加抗生素,到细胞汇合率达 80–85%。对于每个转染样品,步骤如下:

(1) 在 50 μL 的 opti-MEM I 无血清培养基溶解 DNA,混合均匀。

[0031] (2) 使用 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000(Invitrogen 公司,美国)前先温和混匀,在 50 μL 培养基中加入适量的脂质体,室温放置 5 min。

[0032] (3) 孵育 5 min 之后,将溶解的 DNA 与脂质体 2000 混合(V<sub>总</sub>=100 μL)温和混匀,并于室温孵育 20 min(溶液呈现混浊)

注意:混合物于室温下在 6 小时内稳定

(4) 在每个细胞培养孔的培养基中加入 100 μL 混合物,混合地前后晃动培养板。

[0033] (5)在37℃,5%CO<sub>2</sub>中孵育18-48小时,检测转入的基因表达量,在6小时后更换培养基。

[0034] 3.3 rMarTX对BK通道(α+β4)的抑制效应

首先将在HEK293T细胞中表达的BK通道(α+β4)电流由+100mV脉冲刺激诱发,与已报道的BK通道电流特征吻合。如图4-A所示,1μM的rMarTX可以有效地抑制该电流,这种抑制效应与天然毒素十分相近。剂量依赖曲线可显示残余电流(I<sub>f</sub>)的百分比。rMarTX对BK通道(α+β4)电流的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为186nM,与天然MarTX的抑制效应相近;Hill系数为2.41,与天然毒素的性质几乎吻合。

[0035] 3.4 rMarTX对Kv通道的调制作用

hKv3.1a的延迟整流钾电流由+40mV的脉冲刺激激发,但钙电流不能被100nM(I<sub>f</sub>=1.03±0.04,n=9,p>0.05),1μM(I<sub>f</sub>=0.99±0.04,n=9,p>0.05),10μM(I<sub>f</sub>=0.95±0.04,n=3,p>0.05,图5-A和5-D)的rMarTX抑制。rMarTX对由hKv4.2产生的瞬时外向钾电流在100nM(I<sub>f</sub>=0.87±0.16,n=5,p>0.05),1μM(I<sub>f</sub>=0.88±0.09,n=5,p>0.05)和10μM(I<sub>f</sub>=0.92±0.06,n=9,p>0.05,图5-B和5-E)没有明显的调制效应。

rMarTX在100nM(I<sub>f</sub>=0.88±0.02,n=10,p<0.001),1μM(I<sub>f</sub>=0.77±0.05,n=8,p<0.001),10μM(I<sub>f</sub>=0.71±0.04,n=6,p<0.001,图5-C和5-F)能部分抑制mKv1.3通道的钾电流。

[0036] 以上实验结果表明,短链蝎毒素MarTX在分子改造过的pGEX-4T-3系统中被成功表达,其分子量和生物活性与天然MarTX几乎吻合;重组MarTX可选择性地阻断BK通道(α+β4),部分抑制mKv1.3通道的电流,但对hKv4.2和hKv3.1a没有明显的调制效应。

<110> 上海大学

<120> BK 通道的特异性配体的重组质粒及其重组表达方法

<160> 1

<210> 1

<211> 111

<212> DNA

<213> 质粒

<400> 1

TTTGG ACTCA TAGAC GTAAA ATGTT TTGCA TCTAG TGAAT GTTGG ACAGC TTGCA AAAAA 60  
GTAAC AGGAT CGGGA CAAGG AAAGT GCCAG AATAA TCAAT GTCGA TGCTA C 111

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> 引物

<400> 1

TTCGG ATCCT TTGGA CTCAT AGA

23

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> 引物

<400> 1

CTTCC CGGGT TAATC AGTAG CAT

23

<210> 4

<211> 43

<212> DNA

<213> 引物

<400> 1

GATGA CGATG ACAAG TTTGG ACTCA TAGAC GTAAA ATGTT TTG

43

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> 引物

<400> 1

GGATC CACGC GGAAC CAGAT C

21

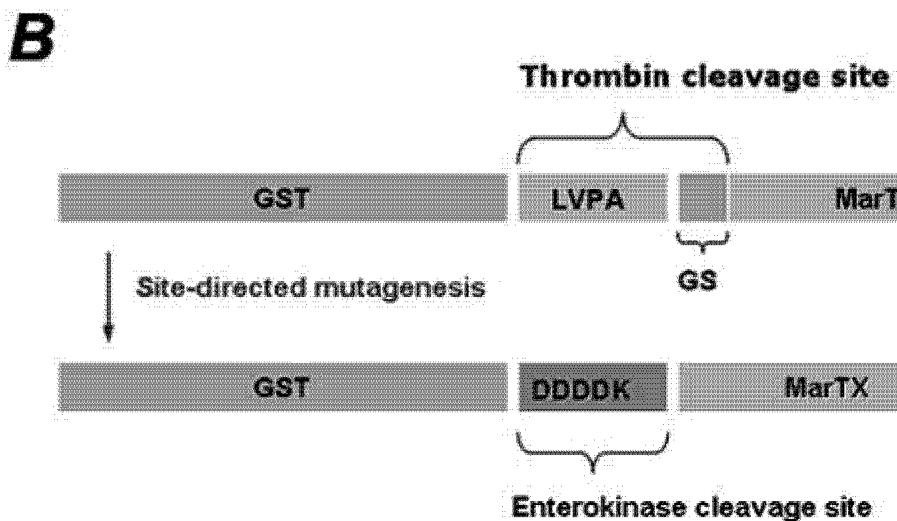
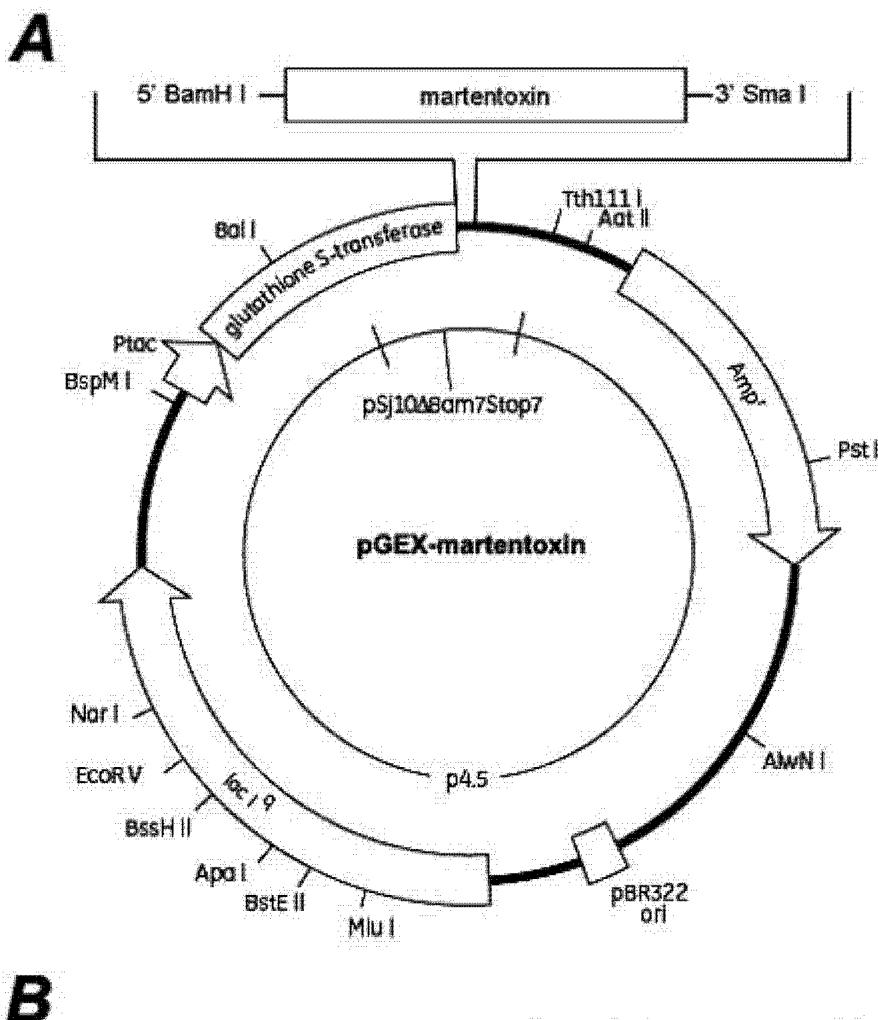


图 1

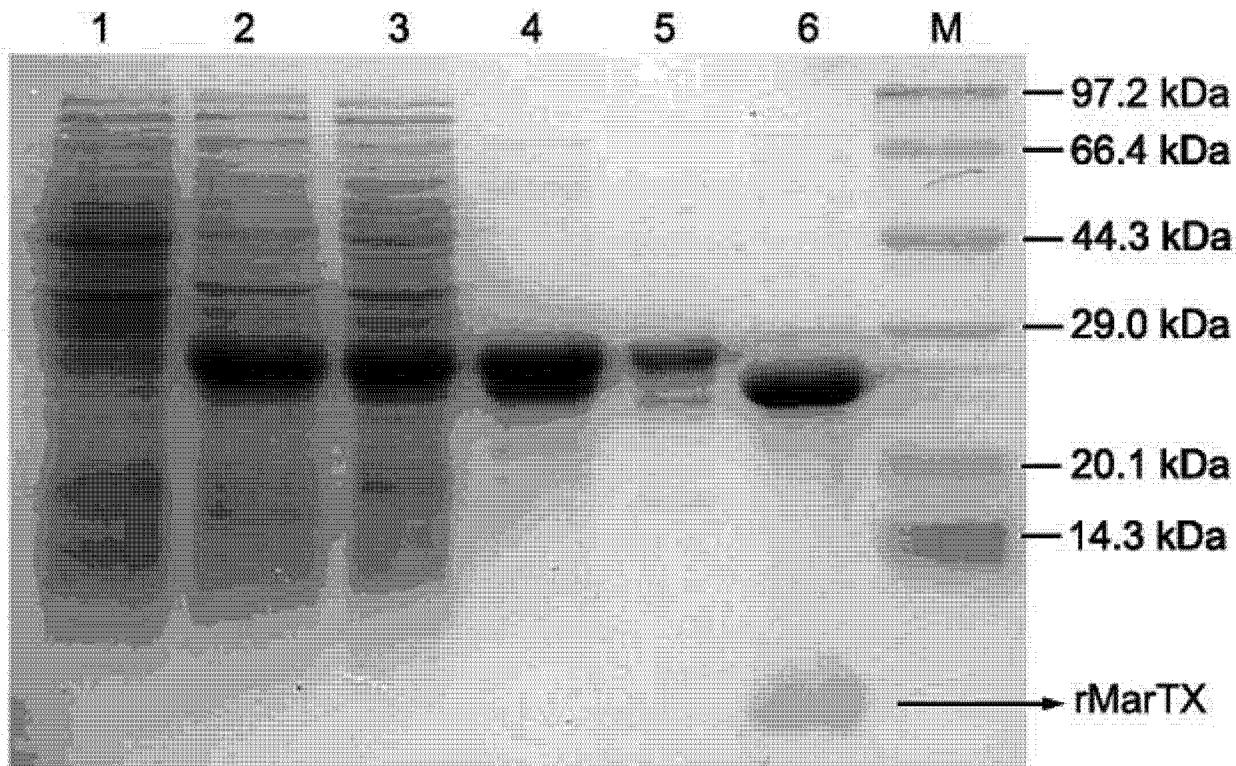


图 2

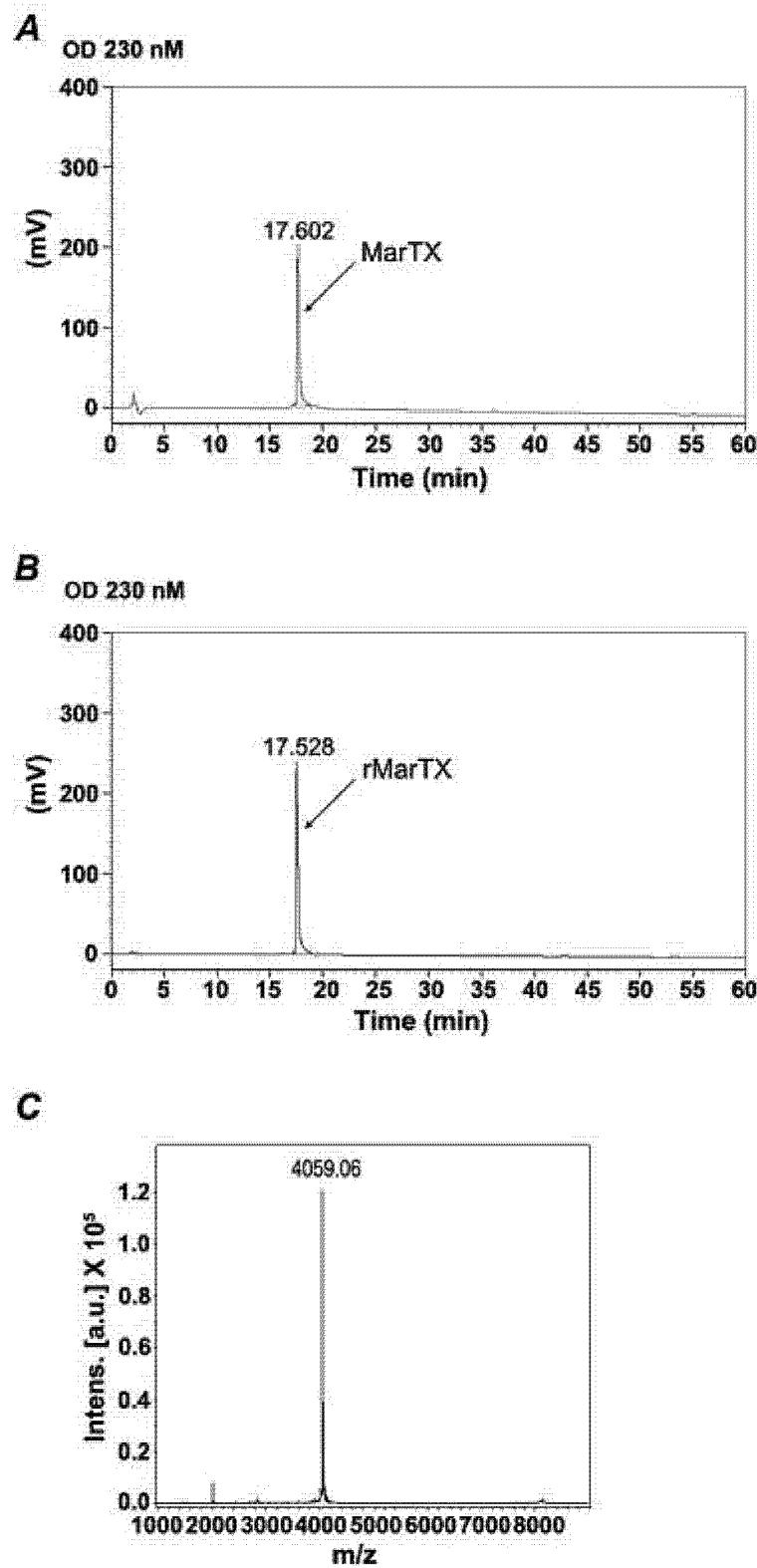


图 3

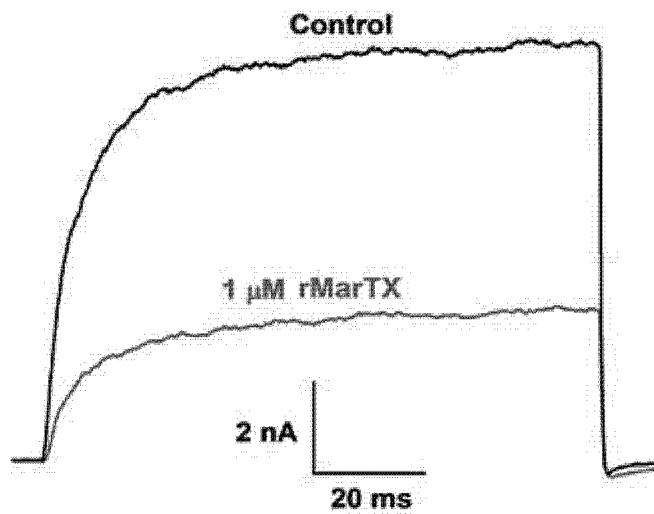
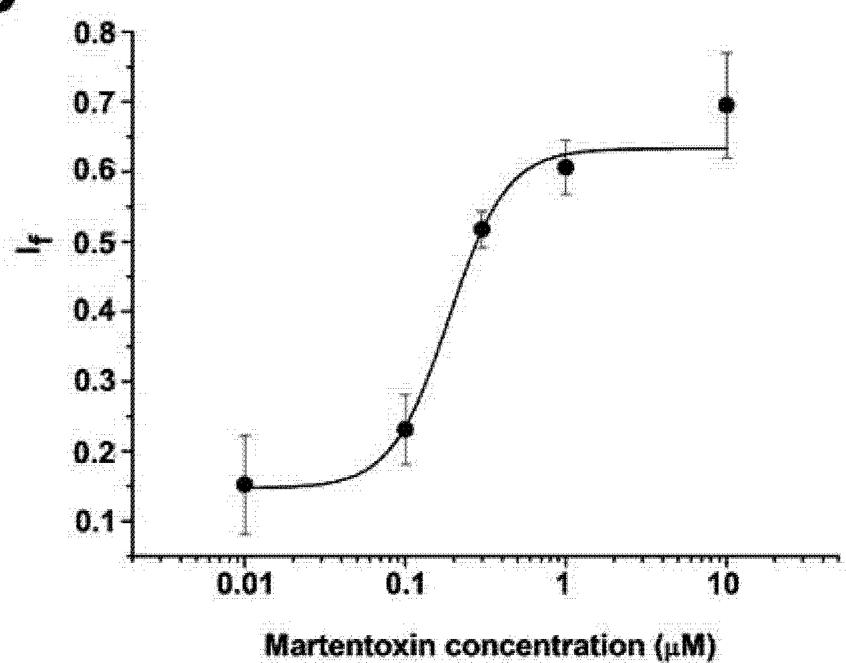
**A****B**

图 4

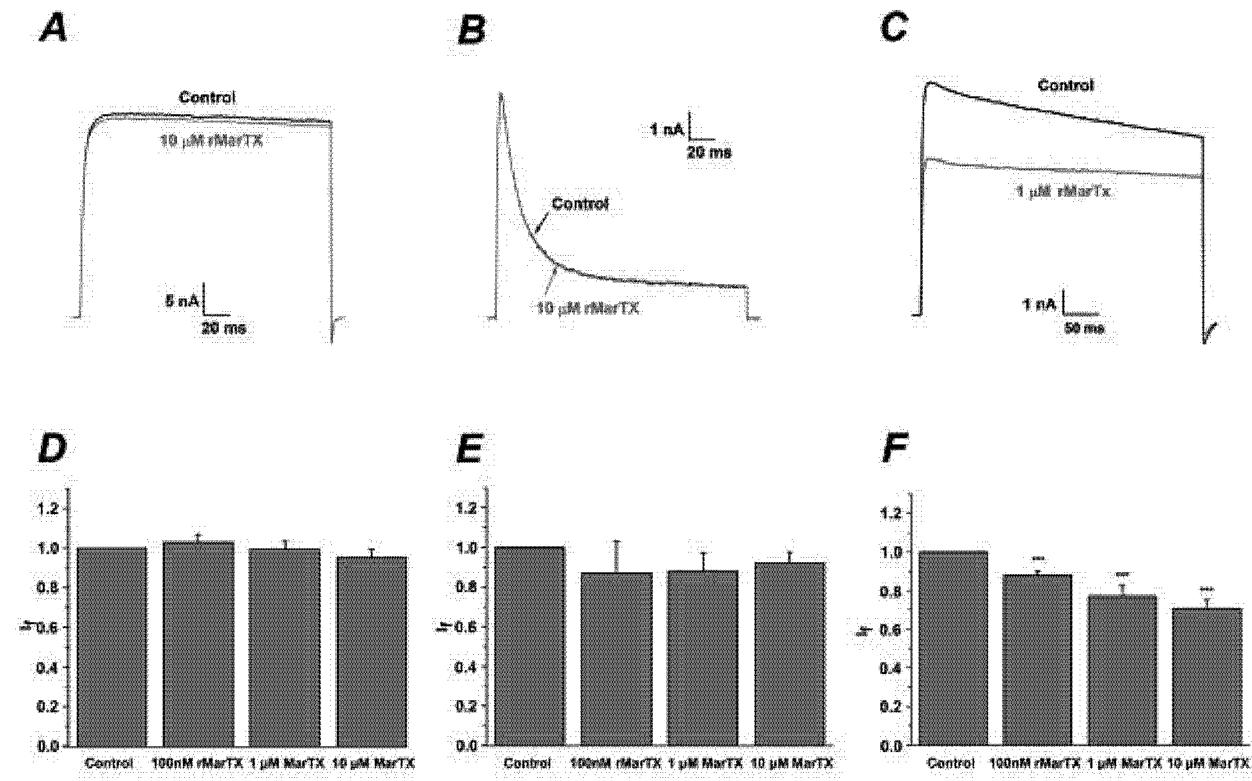


图 5