

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CN9620

計畫名稱：建立針對含雙硫鍵蛇毒蛋白的大腸菌表達系統

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

執行期間：96 年 1 月 1 日至 96 年 12 月 31 日

計畫主持人：江建民

計畫參與人員：陳韋仁、侯皓元

執行單位：嘉南藥理科技大學生物科技系

中華民國□97 年□3 月□26 日

摘要

在本計畫中，我們成功利用大腸菌來表達台灣眼鏡蛇心臟毒 CTX A3。我們利用融合蛋白 ZZ 來增加水溶性，利用細胞間質表達的方式來增加雙硫鍵的正確形成。台灣眼鏡蛇心臟毒素主要被表達在細胞外，胞內細胞間質、細胞質內及胞涵體內都不多。利用親合性管柱，我們可以純化到大腸菌所表達的重組融合心臟毒素 A3，這可以提供未來針對心臟毒素進行突變以改良其性質。

前言

台灣眼鏡蛇心臟毒素(cardiotoxin, CTX)是眼鏡蛇毒液中含量最豐富的毒素 [Lee, 1979; Harvey, 1991]。心臟毒素大約有 60 個胺基酸，具有 4 組雙硫鍵，為以 β -折板構成的三指環的三維結構 [Chen et al., 2005 ; and reference ibid]。它具有的生理活性包括使心肌細胞收縮停止、使紅血球溶解、使骨骼肌壞死(necrosis)、對於特定的腫瘤細胞有毒性，或者抑制蛋白激酶 C 的活性 [Chiou et al. 1993]。心臟毒素對於細胞的可能作用已確認其會與細胞膜作用，能穿入到細胞內[Chien et al., 1994; and reference ibid]；會與葡萄糖胺聚醣(GAGs)作用[Vyas et al., 1997; Wu, 1998]；也會對細胞膜上特定的蛋白質(例如 $\alpha\beta\gamma$ integrin 組合蛋白)作用[Wang et al., 2006; Wu, 2006]。最近的研究更顯示，台灣眼鏡蛇心臟毒素 A3 可以造成若干特定腫瘤細胞的凋亡 [Su et al., 2003; Chien et al., 2004; Yang et al., 2005; Yang et al., 2005; Tsai et al., 2006]，主要為 T 細胞或 K562 細胞。若能闡明心臟毒素的細部結構與其所造成的生理活性之間的關係，則它有可能可以發展成為抗腫瘤或抗病毒藥物、或是藥物的傳輸輔助體。目前，只能由多種蛇毒中純化出的心臟毒素異構體來比較研究，因這些異構體只有若干序列位置發生變異，並無法全面有效地確認結構中特定胺基酸所造成的影响，若能利用重組表達的方式來生產心臟毒素，將有機會來解決這個問題。

心臟毒素本身是一個會對細胞膜作用的蛋白，很可能在表達且有正確結構時會對細胞造成明顯的毒性，因此，常設計利用融合蛋白的方式來表達。過去已有許多學者嘗試在大腸菌中表達心臟毒素 [Chi et al., 1994; Kumar et al., 1996; Chang et al.,

1996]。但不管是直接表達，或是以融合蛋白的形式表達，表達的毒素多以胞涵體(inclusion bodies)的方式存在，很少有以水溶性方式存在。後續的步驟通常都必須經過變性劑處理，先溶出胞涵體內的重組毒素，然後在含有氧化劑/還原劑(例如 GSSG/GSH)的條件下回覆折疊(refolding)，最後再經逆相 HPLC 純化出重組毒素。而最終純化到的毒素的結構正確與否仍必須以 NMR 或是 X-ray 結晶確定。回覆折疊的缺點有(i)對於不同的心臟毒素或是突變體，其氧化劑/還原劑的比例及反應時間都不同，必須逐一調整；(ii)必須有原態(native)毒素，才能在 HPLC 純化時確認；(iii)回覆折疊仍可能發生多相(heterogeneity)的情形。利用胞涵體再回覆折疊並不是一個高效的方法。

文獻中只有 Jeyasseeelan 等人及 Ma 等人在表達 CTX4b (*Naja naja sputatrix*) 及其突變毒素時，可自胞內液中直接得到 GST-CTX 重組毒素 [Jeyaseelan et al., 1998; Ma et al., 2002]，不必經由回覆折疊的過程就可純化到重組的心臟毒素。但是其重組表達的毒素所表現的毒性，卻比純化自蛇毒毒液中的略為降低。這顯示所表達的毒素仍有部份在結構折疊上的不均勻性。

在大腸菌的胞間質(periplasma)中，具有協助蛋白質折疊的分子伴娘(chaperone)系統，也有雙硫鍵異構酶(disulfide isomerase)的系統，可以協助含有雙硫鍵的蛋白正確折疊 [Baneyx and Mujacic, 2004]。而有些胺基酸序列，也會協助將蛋白質由胞間質帶出到胞外。本計畫要利用這些大腸菌已有的系統來表達心臟毒素。

在這個研究計畫中，我們將利用設計的表達載體，使得心臟毒素可以表達到大腸菌的胞間質或是胞外，它將有以下的好處：(i) 利用適當的融合蛋白，可以保護心臟毒蛋白不易被分解，並增加心臟毒素的溶解度；(ii) 利用大腸菌胞間質的氧化還原系統對含有四組雙硫鍵的重組心臟毒素進行折疊，並利用大腸菌胞間質的折疊輔助蛋白，協助心臟毒素折疊；(iii) 大腸菌的胞間質及胞外的蛋白質較少，且蛋白酶也較少，純化融合蛋白的步驟不必將菌體完全破碎，較為簡便，且較不會有蛋白酶的污染。

材料與方法

構築心臟毒素的表達載體：利用連續式表達的啟動子，其後接信號序列，並構築心臟毒素的基因於蛋白質 A 的 ZZ 區塊基因之後。

基因轉殖與表達：利用化學法或是電轉殖法，將構築好的載體轉殖到 Top10 或 JM109 或 DH5 α 菌株中，利用抗生素篩選出轉殖株。而後於含抗生素的不同培養基中，於 37°C 下培養 24 小時。

心臟毒素純化：大腸菌於培養基中培養後，利用離心分離菌體，以凍融法取得胞間質液，利用超微過濾去除 30kD 以上的蛋白質，再利用 IgG 親和性管柱純化而得到重組融合蛋白。

蛋白質電泳及定量：

蛋白質的電泳 SDS Polyacrylamide gel-electrophoresis (SDS-PAGE) 及蛋白質染色參考 Laemmli 的方法 [Laemmli, 1970]，而蛋白質的定量以 Commasiae 法，參考 Bio-Rad 公司的操作手冊。

結果與討論

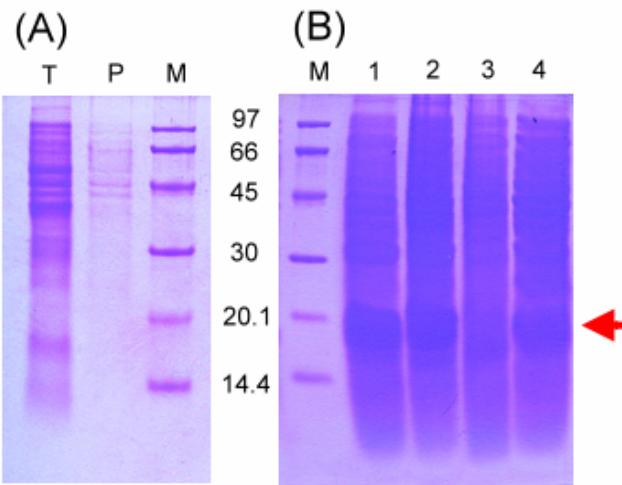
在本計畫中，我們將台灣眼鏡蛇心臟毒素 CTXA3 構築於載體，於啟動子之後接上訊號勝肽，再接上 ZZ 區塊，最後接上心臟毒素。當轉殖入大腸菌 Top10 時可以成功於水溶性表達重組融合蛋白。由圖一中顯示，在胞內幾乎沒有重組心臟毒素，主要的重組心臟毒素都被分泌到胞外。

我們也針對不同培養基的測試，發現轉殖株在 LB 的培養基中可以有最好的表達狀況，結果如圖二所示。而後的培養我們就在 LB 有溝的搖瓶進行。

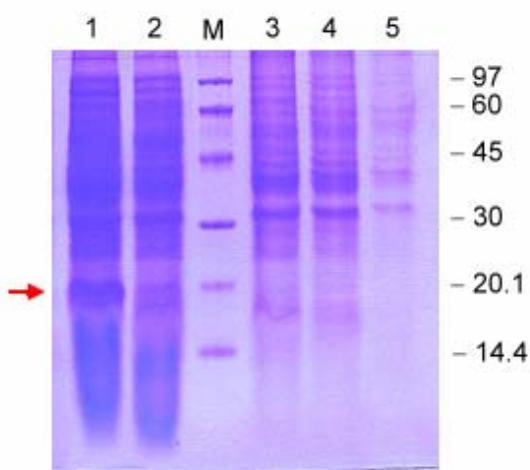
我們接著進行較大量的培養，以期能純化到重組的融合蛋白，在 1 升的培養液培養 24 小時後，培養液經超微過濾後，以 FPLC 進行親和性管柱層析，層析圖如圖三所示。在以酸液進行沖提時有三個 fractions 出現，重組融合蛋白是第三個 fraction，這可以由電泳圖確認，如圖四。

在這個計畫中，我們成功以大腸菌以水溶性方式表達了融合的台灣眼鏡蛇心臟毒素 CTXA3。雖然我們利用連續表達的方式，可以不必加入例如 ITPG 的誘導劑，較為經濟且較易操作，但是總表達量並不多，估計所純化到的量大約為 3mg/L。這可能的原因是所用的啟動子很弱，造成表達的量很少。未來可以使用如 trc 或是 T7 的強啟動子，以增加表達的量。

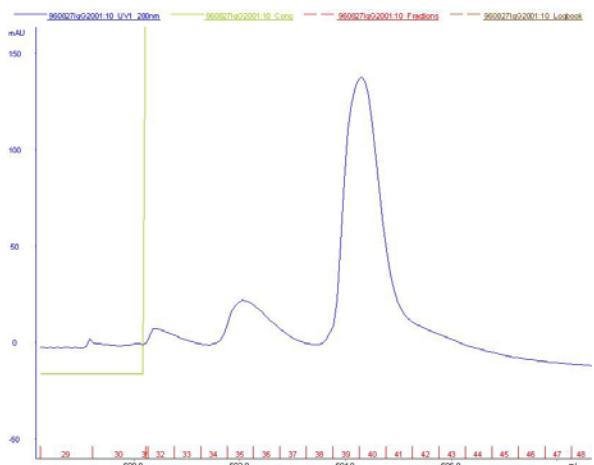
另外，從圖四純化得到重組融合蛋白還可發現，融合蛋白有被分解的現象。這可能是心臟毒素本身就會受到大腸菌蛋白酶的作用，一個改良的方法是改用有蛋白酶缺失的大腸菌，BL21 在細胞間質有兩個蛋白酶基因已被去除，是一個可以用的菌株；另一個可以改良的方法，是更改融合蛋白，改用 PotD 或是 Crr 或是大腸菌細胞間質內的 ecotin 來當作融合蛋白。我們將於未來持續改善台灣眼鏡蛇在大腸菌的表達。



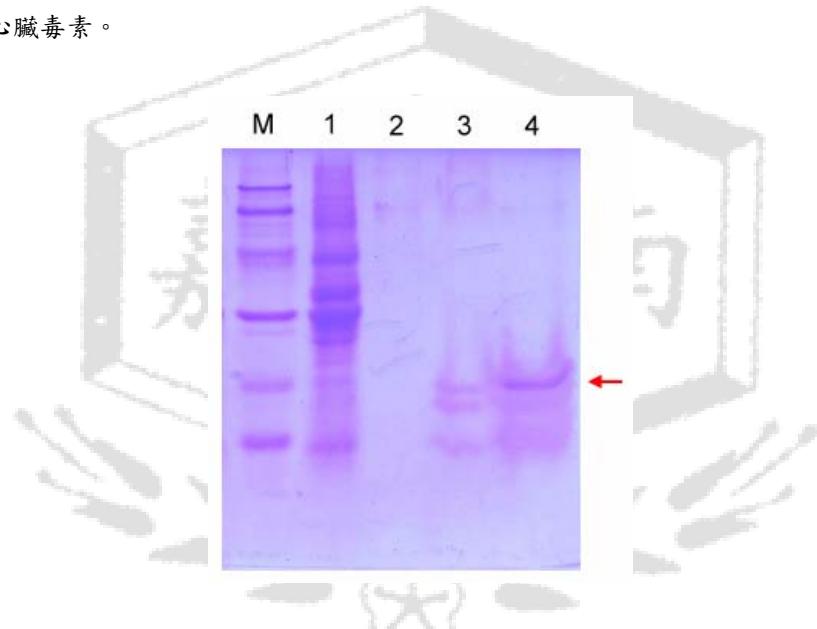
圖一：篩選到的菌株的表達情形，圖(A)：T 為全細胞，P 為細胞間質液。圖(B)為胞外液，1,2,3,4 分別代表篩選出的不同轉殖菌株。



圖二：在不同的培養基培養下的表達情形，lane1：LB 培養基；lane2:LLB 培養基；lane3:TB 培養基；lane4:SB 培養基；lane5:H 培養基。M: 分子量標記。



圖三、以 FPLC 之 IgG 親和性管柱純化的層析圖，從 fraction 39~43 為重組心臟毒素。



圖四、層析後之電泳圖，lane1:沒有被吸附的樣品；lane2:fraction37；lane3:fraction 39；lane4:fraction40。

參考資料

- Baneyx, F. and Mujacic, M (2004) “Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli.*” *Nature Biotechnol.* 22, 1399-1408.
- Chang, L.S., Lin, J. and Wu, P.-F. (1996) “cDNA sequence analysis and expression of cardiotoxin V and a new cardiotoxin VII from *Naja naja atra* (Taiwan cobra)” *Biochim. Biophys. Acta* 1295, 1-4.
- Chang, L.-S., Wu, P.-F. and Lin, J. (1996) “cDNA sequence analysis and expression of cardiotoxins from Taiwan cobra” *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 219, 116-121.
- Chen, T.S., Chung, F.Y., Tjong, S.C., Goh, K.S., Huang, W.N., Chien, K.-Y., Wu, P.-L.,

- Lin, H.-C., Chen, C.J. and Wu, W.-g. (2005) "Structural difference between group I and group II cobra cardiotoxins: X-ray, NMR, and CD analysis of the effect of cis-proline conformation on three-fingered toxins." *Biochemistry* 44, 7414-7426.
- Chi, L.M., Vyas, A.A., Rule, G.S. and Wu, W.-g (1994) "Expression of Glutathione S - transferase cardiotoxin fusion protein in *Escherichia coli*" *Toxicon* 32, 1679-1683.
- Chien, C.-M., Yang, S.-H., Lu, M.-C., Chang, L.-S., and Lin, S.-R. (2004) "Cardiotoxin III induces apoptosis in T24 cells via reactive oxygen species-independent mitochondrial death." *Drug Dev. Res.* 63, 219-224.
- Chien, K.-Y., Chiang, C.-M., Hseu, Y.-C., Vyas, A.A., Rule, G.S., and Wu, W.-g. (1994) "Two distinct types of cardiotoxin as revealed by the structure and activity relationship of their interaction with zwitterionic phospholipid dispersions." *J. Biol. Chem.* 269, 14473-14483.
- Chiou, S.-H., Raynor, R.L., Zheng, B., Chambers, T.C., and Kuo, J.F. (1993) "Cobra venom cardiotoxin (cytotoxin) isoforms and neurotoxin: comparative potency of protein kinase C inhibition and cancer cell cytotoxicity and modes of enzyme inhibition." *Biochemistry* 32, 2062-2067.
- Harvey, A.L. *Snake Toxins*. Pergamon Press, New York. 1991.
- Jeyaseelan, K., Armugan, A., Lachumanan, R., Tan, C.H. and Tan, N.H. (1998) "Six isoforms of cardiotoxin in Malayan spitting cobra (*Naja naja sputatrix*) venom: cloning and characterization of cDNAs" *Biochim. Biophys. Acta* 1380, 209-222.
- Kumar, T.K.S., Yang, P.W., Lin, S.H., Wu, C.Y., Lei, B., Lo, S.J., Tu, S.-C., and Yu, C. (1996) "Cloning, Direct expression, and purificatin of a snake venom cardiotoxin in *Escherichia coli*" *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 219, 450-456.
- Laemmli, U.K. (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227, 680-685.
- Lee, C.Y. *Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology*, vol 52. Springer-Verlag, Berlin. 1979.
- Ma, D., Armugan, A., and Jeyaseelan, K. (2002) "Cytotoxic potency of cardiotoxin from *Naja sputatrix*: development of a new cytolytic assay" *Biochem. J.* 366, 35-43.
- Su, S.-H., Su, S.-J., Lin, S.-R. and Chang, K.-L. (2003) "Cardiotoxin-III selectively enhances activation-induced apoptosis of human CD8+ T lymphocytes." *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 193, 97-105.
- Tsai, C.-H., Yang, S.-H., Chien, C.-M., Lu, M.-C., Lo, C.-S., Lin, Y.-H., Hu, X.-W. and Lin, S.-R. (2006) "Mechanisms of cardiotoxin III-induced apoptosis in human colorectal cancer COLO205 cells." *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 33,

177-182.

- Vyas, A.A., Pan, J.-J., Patel, H.V., Vyan, K.A., Chiang, C.-M., Sheu, Y.-C., Hwang, J.-K., and Wu, W.-g. (1997) "Analysis of binding of cobra cardiotoxins to heparin reveals a new β -sheet heparin-binding structural motif." *J. Biol. Chem.* 272, 9661-9670.
- Wang, C.-H., Liu, J.-H., Lee, S.-C., Hsiao, C.-D., and Wu, W.-g. (2006) "Glycosphingolipid-facilitated membrane insertion and internalization of cobra cardiotoxin" *J. Biol. Chem.* 281, 656-667.
- Wu, P.-L., Lee, S.-C., Chuang, C.-C., Mori, S., Akakura, N., Wu, W.-g., and Takada, Y. (2006) "Non-cytotoxic cobra cardiotoxin A5 binds to alpha(v)beta3 integrin and inhibits bone resorption. Identification of cardiotoxins as non-RGD integrin-binding proteins of the Ly-6 family" *J. Biol. Chem.* 281, 7931-7945.
- Wu, W.-g. (1998) "Cobra cardiotoxin and phospholipase A2 as GAG-binding toxins: on the path from structure to cardiotoxicity and inflammation." *Trends Cardiovasc. Med.* 8, 270-278.
- Yang, S.-H., Chien, C.-M., Lu, M.-C., Lu, Y.-J., Wu, Z.-Z. and Lin, S.-R. (2005) "Cardiotoxin III induces apoptosis in K562 cells through a mitochondrial-mediated pathway." *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 32, 515-520.
- Yang, S.-H., Lu, M.-C., Chien, C.-M., Tsai, C.-H., Lu, Y.-J., Hour, T.-C., and Lin, S.-R. (2005) "Induction of apoptosis in human leukemia K562 cells by cardiotoxin III." *Life Sci.* 76, 2513-2522.