虎纹捕鸟蛛毒素-ILys13突变对生物学活性的影响*

王贤纯 梁宋平**
湖南师范大学生命科学学院，长沙 410081

摘要 从虎纹捕鸟蛛 *Selenocosmia*（*Ornithoctonus*）*huwena* 的粗毒中分离纯化出来的虎纹捕鸟蛛毒素-I(HWTX-I)是一种多肽类神经毒素．为了进一步探明其结构与功能的关系，采用以固相多肽合成为核心技术的蛋白质工程方法直接构建了 Ala 取代 Lys13 的单残基突变体 K13A-HWTX-I，并同时合成了 HWTX-I 的全序列 sHWTX-I 作实验对照．合成产物经质谱和序列分析鉴定无误后在含谷胱甘肽的缓冲体系中氧化折叠并用离子交换和 RP-HPLC 纯化．活性测定结果表明，氧化复性后，sHWTX-I 与天然 HWTX-I 的生物学活性完全相同，而 K13A-HWTX-I 的生物学活性下降了87%，提示 Lys13 是与 HWTX-I 的生物学活性密切相关的重要残基．

关键词 虎纹捕鸟蛛毒素-I 结构与功能 固相多肽合成 蛋白质工程

从虎纹捕鸟蛛 *Selenocosmia*（*Ornithoctonus*）*huwena* 的粗毒中分离纯化出来的虎纹捕鸟蛛毒素-I(HWTX-I)是一种碱性多肽类神经毒素，能可逆性阻断小鼠膈神经-膈肌标本的神经肌肉接头传递，作用位点在突触前膜[1]．梁宋平等已对其理化性质和结构进行了系统的研究，测得该毒素分子由33个氨基酸残基组成，其中有6个 Lys 和1个 Arg；6个 Cys 参与3对二硫键的形成[2,3]．瞿幼星等[4]利用 2D-NMR 技术测定了它在溶液中的空间构象(图1)后指出，HWTX-I 具有自然界普遍存在的“抑制剂胱氨酸结模体”结构模式，其二级结构包括一段三链反平行 β-折叠片和5个 β-转角，整个分子构象由两个大环(Loop)构成．同时还预测，HWTX-I 的生物学活性与其分子中的碱性氨基酸残基有一定程度的相关性；分子构象中由第24～27氨基酸残基构成的第5β-转角可能是主要的活性部位，它位于由 C-端序列构成的环Ⅱ的顶端．为了鉴定 HWTX-I 分子中与生物活性相关的残基和主要的活性区，本研究室对其进行了系统的突变和化学修饰研究，取得了一系列重要的研究结果[5~9]．为了进一步探明其结构与功能的关系，本文用固相多肽合成法直接构建了 Ala 替代 HWTX-I 分子中第13位赖氨酸(Lys 13)残基的突变体 K13A-HWTX-I，并同时合成了 HWTX-I 的全序列 sHWTX-I 作实验对照(图2)，以对 Lys13 与 HWTX-I 生物学活性的关系作出鉴定．

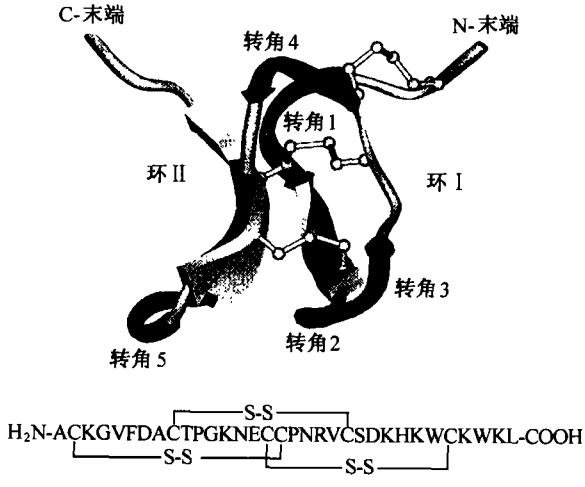

图1 HWTX-I 的空间构象和氨基酸序列及二硫键配对方式

2003-07-14 收稿，2003-08-07 收修改稿
* 国家“八六三”计划资助项目(批准号：103-13-01-06)
** 联系人，E-mail：liangsp@public.cs.hn.cn

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

sHWTX-I H_2N-ACKGVFDACTPGKNECCPNRVCSDKHKWCKWKL-COOH
K13A-HWTX-I H_2N-ACKGVFDACTPGANECCPNRVCSDKHKWCKWKL-COOH

图2 合成多肽的氨基酸序列

1 材料和方法

1.1 试剂

9-芴甲氧羰基(Fmoc)氨基酸衍生物为Millipore公司产品，其中部分氨基酸侧链的保护方法如下：Arg为2，2，4，6，7-五甲二氢苯并呋喃-5-磺酰基(Pbf)保护；Glu和Asp为叔丁酯(OtBu)；Ser和Thr为叔丁醚(tBu)；Cys，His和Asn为三苯甲基(Trt)；Lys为叔丁氧羰基(Boc)；二甲基甲酰胺(DMF)、苯并三唑四甲基脲四氟硼酸盐(TBTU)、1-羟基苯并三唑(HOBt)、N-甲基吗林(NMM)、二硫苏糖醇(DTT)、还原型谷胱甘肽(GSH)、氧化型谷胱甘肽(GSSG)、三氟乙酸(TFA)和哌啶(Piperidine)均为Sigma公司产品；PEG-PS·HCI树脂为PerSeptive Biosystems公司产品.

1.2 固相多肽合成

采用固相Fmoc方法[10]在多肽合成仪上合成各多肽，合成规模为0.1 mmol. 用PEG-PS·HCI树脂，Fmoc氨基酸5倍过量；溶剂为DMF，激活与催化系统为TBTU-HOBt-NMM；用20%哌啶去Fmoc保护. 多肽链合成时从C-端向N-端延伸，最后一个氨基酸残基偶联完成并脱去其Fmoc基团后，全部侧链保护基团的去除和树脂的切除用试剂R(TFA:苯甲硫醚:二巯基乙烷:苯甲醚=90:5:3:2 V/V)同时进行. 室温下反应2.5 h后用高纯氮气吹滤. 滤液中的目的肽用预冷乙醚沉淀，离心收集沉淀，乙醚洗涤3次后冷冻干燥过夜.

1.3 氧化折叠和分离纯化

由于合成的多肽刚从固相树脂上裂解下来时处于变性状态，所以必须对其进行复性处理，使其经氧化折叠过程形成发挥生物学功能所需的分子构象. 首先用sHWTX-I作模式分子参照文献[11,12]的方法探索复性条件，然后在相同的条件下对K13A-HWTX-I进行复性处理：经还原和脱盐纯化的样品溶入适当体积的乙酸胺缓冲液(0.1 mol/L，0.002 mol/L EDTA，0.003 mol/L GSH和0.0003 mol/LGSSG，pH 8.5)中，使样浓度在10^{-5} mol/L左右. 室温(20～25℃)条件下反应24～48 h后，用冰醋酸酸化反应混合液至pH 3.0～4.0并用反相柱脱盐. 经脱盐的氧化型多肽样品的进一步纯化在带Waters P-1 CM阳离子交换柱(5 mm×100 mm)的Waters 650E色谱系统上进行. 洗脱液为：(A) 0.2 mol/L NaH_2PO_4，(B) 0.2 mol/L Na_2HPO_4，(C)1.0 mol/L NaCl，(D)双蒸水. 线性梯度(40 min内，0～60%的洗脱液C)洗脱，洗脱速度为0.7 mL/min.

1.4 产物的鉴定

准确质量测定在英国Micromass公司生产的LCT电喷雾质谱仪上进行. 序列分析在MilliGen公司6600型固相蛋白质序列分析仪上进行.

1.5 生物学活性的检测

参照文献[13]的方法，用离体小白鼠膈神经-膈肌标本测定天然HWTX-I(nHWTX-I)，sHWTX-I和K13A-HWTX-I的神经毒活性：将新剥制的小鼠膈神经-膈肌标本置于一盛有台氏液的标本槽中. 利用塑料小管不断向标本槽的溶液中输送95% O_2和5% CO_2的混合气体. 用循环恒温水浴使标本槽内溶液的温度保持在30～32℃. 通过吸附电极向标本的膈神经施加频率为0.2 Hz的电刺激(超强刺激，方波)，因此而引起的膈肌收缩反应由传感器转化为电信号，放大后由二道生理仪纪录下来. 根据台氏液中一定样品浓度下阻断膈神经-膈肌接头传递的时间来确定合成多肽神经毒活性的相对大小.

2 结果

2.1 多肽的合成效果

RP-HPLC分析结果表明，2个合成多肽粗品中都含有一个明显的主峰和小的杂质峰(见图3).

质谱分析结果证明，各合成粗品的主峰成分的分子量与目的肽分子量相符，序列分析结果亦显示合成无误，说明合成是有效和成功的.

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

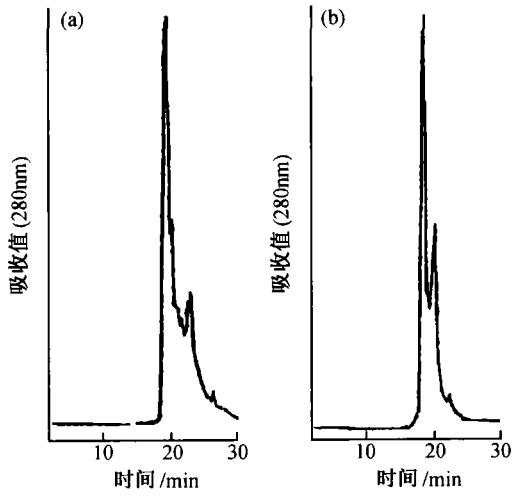

图3 合成多肽粗品的 RP-HPLC 分析图

(a)sHWTX-I; (b)K13A-HWTX-I. 层析柱: YWG C18 10 μm 反相柱, 3.9 mm×300 mm; 洗脱液: (A)0.1 % TFA; (B)含 0.1% TFA 的乙腈; 流速: 0.7 mL/min; 柱室温度: 40℃

2.2 复性产物的分离纯化与鉴定

合成多肽经复性处理后, 先用 RP-HPLC 脱盐纯化, 然后用离子交换 HPLC 进一步纯化. 根据质谱监测的多肽分子量变化和初步的活性分析结果判断主要的复性峰. K13A-HWTX-I 的离子交换结果见图 4.

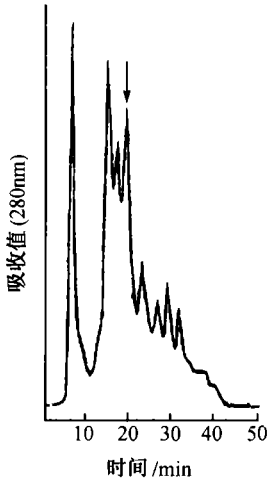

图4 氧化复性处理后 K13A-HWTX-I 的离子交换图

质谱分析和活性检测结果表明, 图 4 中箭头标注的谱峰物质即为 K13A-HWTX-I 的复性肽. 经分析型 RP-HPLC 再脱盐纯化后得到一个尖而对称的主峰(图未列出), 提示样品已纯化至均一程度. K13A-HWTX-I 的质谱分析结果见图 5.

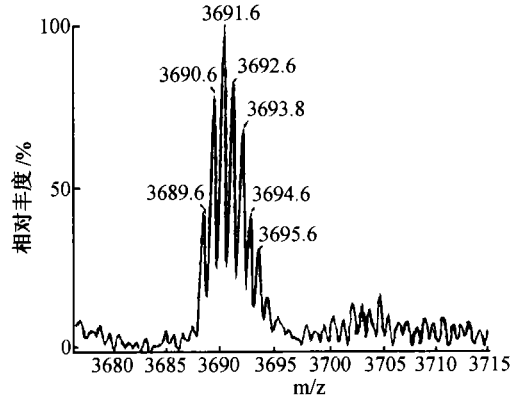

图5 复性 K13A-HWTX-I 质谱分析图

图 5 显示, K13A-HWTX-I 的分子量($M+H^+$)为 3691.6Da, 而其还原态理论值($M+H^+$)为 3697.7 Da, 提示在氧化折叠过程中 6 个巯基脱去 6 个质子形成了 3 对二硫键.

2.3 生物学活性测定

活性测定结果($n=3$)列于表 1. 从中可见, sHWTX-I 能够显示出与 nHWTX-I 完全相同的生物学活性, 说明实验中有关复性和分离纯化等方面的条件是适宜的. Ala 替代 HWTX-I 的 Lys13 后, HWTX-I 的神经毒活性下降了 87%, 提示 Lys13 是与 HWTX-I 的生物学活性密切相关的重要残基.

表1 天然 HWTX-I 和合成多肽对小白鼠膈神经-膈肌标本接头传递的影响($n=3$)

多肽名称	浓度/mol·L^{-1}	阻断时间/min	相对活性/%
nHWTX-I	2.7×10^{-6}	27.0±1.0	100
sHWTX-I	2.7×10^{-6}	26.8±2.3	100
K13A-HWTX-I	5.4×10^{-6}	102.0±3.6	13

3 讨论

序列测定是鉴定多肽合成真实性的可靠方法, 而现代生物质谱技术能够准确地测定合成产物的分子量, 所以也能提供相当可靠的鉴定结果, 因为只要合成产物的分子量与其理论值相符, 一般就可认为合成是成功的, 除非操作者在往合成仪的转盘上插氨基酸管时插错了顺序. 本实验中的质谱分析结

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

果和序列测定都表明2个目标肽的合成是正确的.

通过质谱分析还可获得有关多肽复性过程中二硫键的形成情况. 还原型 sHWTX-I 和 K13A-HWTX-I 经氧化折叠后, 分子量均减少 6 Da, 提示在氧化折叠过程中, 它们分子中的 6 个-SH 都参与了二硫键的形成. 尽管本文工作中没有具体测定分子中的二硫键配对方式, 但 sHWTX-I 通过氧化复性及分离纯化后, 生物学活性达到了与天然 HWTX-I 完全相同的水平, 提示它具有与天然 HWTX-I 相同的空间构象和二硫键配对方式, 同时也说明了氧化复性和分离纯化效果的可靠性. 梁宋平等[14]曾对类似条件下固相化学合成和复性处理的 HWTX-I 进行肽谱和一维核磁共振谱等多项指标的分析, 证明化学合成的 HWTX-I 复性后具有与天然 HWTX-I 相同的化学结构和空间结构. 此外, K13A-HWTX-I 由 HWTX-I 的单残基突变而来, 无论从理论上推断, 还是分子构象模拟结果(图未列出)都显示其分子构象无明显变化, 因而可以认为在与 sHWTX-I 相同或相似的条件下, K13A-HWTX-I 也能正确地氧化折叠. 此外, 研究中的相关实验结果还表明, sHWTX-I 和 K13A-HWTX-I 氧化折叠处理以前的样品和"复性峰"以外的样品完全不能显示阻断神经肌肉接头传递的活性, 所以, 生物学活性的测定结果也间接地证明了氧化折叠的正确性.

以固相化学合成为核心技术的蛋白质工程研究是在对蛋白质多肽的结构和功能有了一定了解的基础上进行的. 可采用的方法包括氨基酸残基或片段的替换、删除、插入和变换等[15~17]. 进行单残基替换突变时, 一般是将可能的关键残基用 Ala, Gly 或侧链基团性质差异较大的其他氨基酸残基替换. 若替换突变后蛋白质多肽的活性大幅度降低或完全丧失, 则被替换的残基是与活性密切相关的关键残基, 反之则是与活性关系不大或无关的残基. 本研究中, 利用 Ala 替换 HWTX-I 的 Lys13, 然后根据 K13A-HWTX-I 阻断小白鼠膈神经-膈肌标本接头传递的能力判断 Lys13 与 HWTX-I 生物学活性的关系. 结果表明, 与天然 HWTX-I 相比, K13A-HWTX-I 的生物学活性降低了 87%, 提示 HWTX-I 的第 13 位 Lys 是与 HWTX-I 生物学活性密切相关的重要残基. HWTX-I 分子中的 Lys13 被 Ala 替代后, 由于还有其他活性相关残基(如 N-端序列中的 Lys3[5]和 Arg20[8]等)和 C-端回环区序列存在, 分子构象也未发生大的变化, 所以仍能显出 13% 的生物学活性, 这与 2D-NMR 研究的分析推断[4]和其他相关研究结论是一致的, 如廖黔宁等[6]合成和研究了去掉 HWTX-I N-端 Ala 和 C-端 Lys30-Trp31-Lys32-Leu33 共 5 个残基的 28 肽类似物后发现, 该 28 肽仍能保持约 25% 的活性, 认为去掉 N 端和 C 端 5 个残基后的 HWTX-I 分子仍能进行正确的折叠, 且 HWTX-I 的活性部位主要在回环区域.

综上所述, HWTX-ILys13 突变体的成功合成与活性鉴定, 不仅对于研究 HWTX-I 的结构与功能关系具有重要意义, 而且为利用 HWTX-I 作为设计新功能多肽的结构骨架提供了一定的理论基础, 同时也为以固相化学合成为核心技术的蛋白质工程研究建立和完善了可以借鉴的方法.

参 考 文 献

1 陈湘定, 等. 虎纹捕鸟蛛毒素-I(HWTX-I)对豚鼠回肠的作用机制研究. 生命科学研究, 1998, 2(4): 273

2 Liang S P, et al. Properties and amino acid sequence of huwentoxin-I, a neurotoxin purified from the venom of the Chinese bird spider *selenocosmia*. Toxicon, 1993, 31 (8): 969

3 Zhang D Y, et al. Assignment of the three disulfide bridges of huwentoxin-I, a neurotoxin from the spider *selenocosmia*. J Protein Chem, 1993, 12: 735

4 Qu Y X, et al. Proton nuclear magnetic resonance studies on huwentoxin-I from the Venom of the spider *Selenocosmia* huwena: 2. three-dimensional structure in solution. J protein Chem, 1997, 16(6): 565

5 王贤纯, 等. 虎纹捕鸟蛛毒素-I 突变体 K3A-HWTX-I 的化学合成与生理活性分析. 生命科学研究, 1998, 2(2): 87

6 廖黔宁, 等. 虎纹捕鸟蛛素- I(HWTX-I)28 肽类似物的化学合成与活性鉴定. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, 15(5): 756

7 王贤纯, 等. 虎纹捕鸟蛛毒素-I 突变体 A1Y-HWTX-I 的固相合成和生物学活性测定. 中国生物化学与分子生物学报. 2000, 16(3): 357

8 王贤纯, 等. 虎纹捕鸟蛛毒素-I 单残基突变体 R20A-HWTX-I 的化学合成与性质分析. 生物工程学报, 2000, 16(4): 490

9 陈 平, 等. 虎纹捕鸟蛛毒素-I 中组氨酸残基修饰与活性的关系. 中国生物化学与分子生物学报, 2001, 17(5): 642

10 Atherton E, et al. Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach. Oxford: Oxford University Press, 1989. 47~122

11 Saxena V P, et al. Formation of three-dimensional structure in pro-

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

teins. I. Rapid nonenzymic reactivation of reduced lysozyme. Biochemistry, 1970, 9: 5015

12 Creighton T E. Disulfide bond formation in proteins. Methods Enzymol, 1984, 107: 305

13 Zhou P A, et al. Blockade of neuromuscular transmission by huwentoxin-I, purified from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena*. Toxicon, 1997, 35: 39

14 Liang S P, et al. Solid-phase synthesis of huwentoxin-I and its structure and bioactivity analysis. Science in China, series C, 1997, 40(5): 449

15 Sato K, et al. Role of basic residues for the binding of omega-conotoxin GVIA to N-type calcium channels. Biochem Biophy Res Commun, 1993, 94(3): 1292

16 Nishio H, et al. Synthesis of omega-agatoxin IVA and its related peptides. Biochem Biophy Res Commun, 1993, 196(3): 1447

17 Nadasdi L, et al. Structure-activity analysis of a conus peptide blocker of N-type neuronal calcium channels. Biochemistry, 1995, 34(25): 8067

2003年预防医学学科国家自然科学基金结题项目评价分析

2003年度预防医学学科国家自然科学基金结题项目共有84项，主要是1999年批准的项目(69项). 其中，面上项目79项(自由申请项目63项，青年科学基金11项，地区科学基金2项，其他3项)，重点项目2项，国家杰出青年科学基金2项，海外青年学者合作研究基金1项. 资助总金额1356.3万元.

(1) 完成论著情况

2003年预防医学学科国家自然科学基金结题项目共发表论文544篇，其中国内发表484篇，国外60篇，内含SCI收录论文82篇. 从每10万元发表文章数量上看，发表在国内核心刊物上的文章中，青年基金项目、海外青年学者合作研究基金和自由申请项目较多，均超过了4篇. 而从每10万元发表的SCI收录文章数量上看，国家杰出青年科学基金项目最多，约1.2篇，其次为重点项目(约0.9篇)、自由申请项目(约0.6篇)和海外青年学者合作研究基金项目(约0.3篇).

(2) 参加学术会议情况

项目承担人及参加人员共参加学术会议148次，其中国内会议98次(42次为特邀发言)，国际会议50次(11次为特邀发言).

(3) 申请专利情况

已批准专利3项，有8项尚在申请中.

(4) 获奖情况

获国家级奖1项，部委级奖1项，省市级奖6项.

(5) 人才培养情况

共培养博士后11人，博士136人，硕士141人和学术带头人63人. 其中自由申请项目在人才培养方面的作用较为突出，共培养博士和博士后102名，硕士103名，学术带头人48名.

简要评价分析：从完成基金项目的依托单位分析，军事医学科学院、第二军医大学、中国疾病预防控制中心、北京大学、哈尔滨医科大学等是获预防医学学科资助项目较多的单位，其科研力量较强、研究基础较好、技术力量雄厚，在本学科领域具有明显的优势和特色，形成了一批高水平的专业实验室和研究中心，科技信息和国际合作与交流的机会相对多一些，申请的标书创新性相对较强，质量相对较高. 另一方面，从发表研究论文的数量和质量来看，上述几家单位完成情况普遍较好，研究论文均在国内核心刊物发表. 在国家自然科学基金近几年的资助下，部分研究基础较好的科研单位在研究工作中逐步形成了具有一定特色的项目体系.

供稿：张作文 冷曙光 唐 霓

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net