

研究报告

Arg20 突变对敬钊缨毛蛛毒素-V 钠通道活性的影响

曾雄智¹, 邓梅春¹, 皮建辉², 全妙华², 王贤纯¹, 梁宋平¹

1 湖南师范大学 蛋白质化学与发育生物学教育部重点实验室,长沙 410081

2 怀化学院生物工程系,怀化 418008

摘要: 敬钊缨毛蛛毒素-V(Jingzhaotoxin-V, JZTX-V)是从敬钊缨毛蛛粗毒中纯化到的一种新型河豚毒素不敏感型钠通道抑制剂,为了深入研究该毒素的结构与功能关系,应用苄甲氧羰基(Fmoc)固相多肽化学合成方法合成了用丙氨酸(Ala)替代 JZTX-V 第 20 位精氨酸残基的突变体 R20A-JZTX-V,合成线性多肽经反相高效液相色谱分离纯化后进行谷胱甘肽氧化复性。复性产物分别用基质辅助激光解析飞行时间质谱(MALDI-TOF/TOF MS)进行分子量的鉴定,用膜片钳电生理方法进行电压门控钠通道抑制活性分析。研究结果表明,Arg20 被 Ala 取代后,R20A-JZTX-V 对大鼠背根神经节细胞(DRG)膜上表达的河豚毒素敏感型(TTX-S)钠通道的抑制活性与天然 JZTX-V 相当,提示 Arg20 与 JZTX-V 对 TTX-S 钠通道的抑制活性无关或关系不大;而 R20A-JZTX-V 对 TTX-R 钠通道的抑制活性却比天然 JZTX-V 下降了约 18.3 倍,说明 Arg20 是与 JZTX-V 对河豚毒素不敏感型(TTX-R)钠通道抑制活性相关的关键活性残基之一,推测 R20A-JZTX-V 活性降低的原因是用 Ala 替代 Arg20 后改变了 JZTX-V 与 TTX-R 型钠通道的作用位点。

关键词: 敬钊缨毛蛛毒素-V, 固相多肽合成, 突变体, 氧化复性, 膜片钳

Effects of Arg20 Mutation on Sodium Channels Activity of JZTX-V

Xiongzhi Zeng¹, Meichun Deng¹, Jianhui Pi², Miaohua Quan², Xianchun Wang¹, and Songping Liang¹

1 The Key Laboratory of Protein Chemistry and Developmental Biology of Ministry of Education, Hunan Normal University, Changsha 410081, China

2 Department of Biological Engineering of Huaihua College, Huaihua 418008, China

Abstract: Jingzhaotoxin-V(JZTX-V) isolated from the venom of the spider *Chilobrachys jingzhao* is a novel potent inhibitor that acts on tetrodotoxin-resistant and tetrodotoxin-sensitive sodium channels in adult rat dorsal root ganglion(DRG) neurons. It is a 29-residue polypeptide toxin including three disulfide bridges. To investigate the structure-function relationship of the toxin, a mutant of JZTX-V in which Arg20 was substituted by Ala, was synthesized by solid-phase chemistry method with Fmoc-protected amino acids on the PS3 automated peptide synthesizer. The synthetic linear peptide was then purified by reversed-phase high performance liquid chromatography and oxidatively refolded under the optimal conditions. The refolded product was analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry(MALDI-TOF MS) and electrophysiological experiments for its relative molecular weight and prohibitive activity of sodium channels respectively. The present findings show that the prohibitive effect of

Received: October 30, 2007; **Accepted:** January 16, 2008

Supported by: the National 973 Project of China (No. 2006CB708508), the National High Technology 863 Project of China (No. 2006AA02Z141), the National Natural Science Foundation of China (Nos. 30430170, 30670640 and 30500146), Hunan Provincial Natural Science Foundation of China (No. 07JJ3072), and Scientific Research Fund of Hunan Provincial Education Department(No. 06C503).

Corresponding author: Songping Liang. Tel: +86-731-8872556; Fax: +86-731-8861304; E-mail: liangsp@hunnu.edu.cn

国家 973 项目(No. 2006CB708508)与 863 项目 (No. 2006AA02Z141), 国家自然科学基金重点项目与面上项目 (Nos. 30430170, 30670640, 30500146),湖南省自然科学基金项目 (No. 07JJ3072), 湖南省教育厅资助科研项目(No. 06C503)。

R20A-JZTX-V on TTX-S sodium channels in DRG neurons is almost the same as that of native JZTX-V, suggesting that Arg20 does not play any important role in inhibiting TTX-S sodium currents in DRG neurons. In contrast, the prohibitive level of R20A-JZTX-V on TTX-R sodium channels is reduced by at least 18.3 times, indicating that Arg20 is a key amino acid residue relative to the bioactivity of JZTX-V. It is presumed that the decrease in activity of R20A-JZTX-V is due to the changes of the property in the binding site in TTX-R sodium channels.

Keywords: JZTX-V, solid-phase synthesis, mutant, oxidative refolding, patch-clamp

敬钊缨毛蛛毒素-V(Jingzhaotoxin-V,JZTX-V)是从我国新发现珍稀蜘蛛敬钊缨毛蛛(*Chilobrachys jingzhao*)^[1]粗毒中纯化到的一种新型肽类神经毒素。该毒素由 29 个氨基酸残基组成,其一级结构为 YCQKWMWTCDSKRACCEGLRCKLWCRKII,其中6个半胱氨酸按照 1-4(Cys2-Cys16)、2-5(Cys9-Cys21)、3-6(Cys15-Cys25)的连接模式形成三对二硫键。电生理活性测定表明,JZTX-V 能够强有力抑制大鼠背根神经节(DRG)细胞上的河豚毒素不敏感型(TTX-R)与河豚毒素敏感型(TTX-S)钠电流,其 IC₅₀值分别是 27.6 nmol/L 和 30.2 nmol/L^[2]。鉴于河豚毒素不敏感型钠通道只在外周感觉神经元中表达,而且抑制此类通道能够产生明显的镇痛效果却没有类似目前临床镇痛药物的毒副作用^[3],因此 JZTX-V 具有开发成新型镇痛药物的医用前景。为了进一步研究该毒素的结构与功能关系,本研究采用固相苄氧羰基(Fmoc)多肽合成技术合成了敬钊缨毛蛛毒素-V 的单残基突变体(R20A-JZTX-V),合成线性多肽经氧化还原复性后,利用膜片钳技术对复性产物进行了电压门控钠通道活性研究,证实第 20 位的精氨酸残基在 JZTX-V 与电压门控钠通道结合活性中的关键作用。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

苄氧羰基(Fmoc)氨基酸,二甲基甲酰胺(DMF),HBTU、还原型谷胱甘肽(GSH)、氧化型谷胱甘肽(GSSG)、哌啶(Piperidine)、三氟乙酸(TFA)、Rink Resin 树脂均从吉尔生化有限公司购买;NMG(N-methyl-D-glucamine)、D-glucose、EGTA、MgATP、Trypsin、Li₂GTP、HEPES 均自 Sigma-Aldrich。

PS3 多肽合成仪(Protein Technologies),Ultraflex MALDI-TOF/TOF 质谱仪(Bruker),EPC-9 电生理记录仪(HEKA)。

1.2 突变体的化学合成与分离纯化

参考文献[4]的方法,利用 PS3 多肽合成仪完成

突变体 R20A-JZTX-V 的固相化学合成。合成粗品采用半制备型反相 HPLC 进行分离纯化(Phenomenex C18 柱,10.0 mm × 250 mm;洗脱液 A:含 0.1% TFA 的水溶液;洗脱液 B:含 0.1% TFA 的乙腈;线性梯度:25 min 内 B 液 25%~33%;流速 3 mL/min),利用质谱确定目的肽,收集洗脱峰并冻干备用。

1.3 合成多肽的氧化还原复性

参考文献[5,9]的方法,利用分析型 RP-HPLC (Phenomenex C18 柱,4.60 mm × 250mm;洗脱液 A、B 同前,线性梯度:25 min 内 B 液 22%~32%;流速 1.0 mL/min)在不同条件下对复性的产率进行监测,以便探索突变体 R20A-JZTX-V 的最适氧化还原复性条件。

1.4 合成多肽与复性产物的质谱分析

采用 Ultraflex TOF/TOF 质谱仪测定合成多肽与复性产物的相对分子质量。

1.5 膜片钳电生理活性鉴定

全细胞膜片钳实验采用急性分离和短期培养的大鼠 DRG 神经元细胞进行。玻璃电极经两步拉制仪(PC-10, Narishige)两步拉制后热抛光,充电极内液后入水电阻为 2~3 MΩ。用于钠电流记录的细胞外液为:150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L KCl, 5 mmol/L D-glucose, 1 mmol/L MgCl₂, 1.5 mmol/L CaCl₂, 10 mmol/L HEPES, pH 为 7.40。电极内液为:105 mmol/L CsF, 35 mmol/L NaCl, 10 mmol/L HEPES 和 10 mmol/L ECTA, pH 为 7.40。实验细胞形成全细胞记录模式后稳定 4~6 min。记录电流经 EPC-9 放大器(HEKA, German)10 kHz 滤波过滤。线性漏电流和电容电流用 p/4 程序予以删除,数据和图形用 pulsefit + pulse 8.0 软件采集分析。

2 结果与讨论

2.1 突变体的化学合成

化学合成的突变体 R20A-JZTX-V 粗品经真空冷冻干燥后为白色粉末,采用 RP-HPLC 分离后,收

集所有比较明显的洗脱峰,经 MALDI-TOF/TOF 质谱仪鉴定,其中保留时间为 16.68 min 的最大洗脱峰为目的峰(图 1),其相对分子质量为 3527.33,与理论分子量(MH^+)3528.29 相符。该洗脱峰的质谱图显示为单一离子峰,证明 R20A-JZTX-V 的合成非常成功,且产物纯度较高。

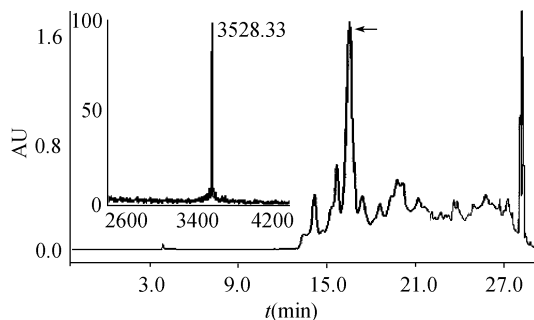


图 1 突变体合成粗品的 HPLC 和质谱分析图谱
Fig. 1 RP-HPLC chromatogram and mass spectra of synthetic crude mutant

The synthetic R20A-JZTX-V was applied to a phenomenex C18 column (10.0 mm \times 250 mm) pre-equilibrated with 0.1% TFA. Elution was performed with a linear gradient of 25%~33% acetonitrile over 25 min at a flow rate 3.0 mL/min at 40°C. The inset showed the peak of interest

2.2 突变体的氧化还原复性

化学合成的突变体是线性分子,没有生物学活性,须要进行氧化复性使其形成正确的空间结构和二硫键配对才能恢复生物学活性。但氧化复性是一个非常复杂的过程,受多种因素的影响,且不同的多肽氧化复性的条件也不尽相同,因此在大量合成多肽进行复性前,有必要探索其最佳氧化复性条件。突变体 R20A-JZTX-V 分子中疏水性氨基酸残基比较多,冻干样品在复性缓冲溶液中的溶解性较差,并且非常容易聚集,因此复性产率非常低。在实验探索中通过先将冻干样品溶于少量蒸馏水,再混入复性缓冲溶液中,10 min 后再加入谷胱甘肽的方法非常好的解决了突变体 R20A-JZTX-V 在复性过程中溶解性差、容易聚集、复性产率低的问题。通过比较研究显示 R20A-JZTX-V 的最佳氧化复性方法为谷胱甘肽氧化复性法,具体复性条件为: 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液、pH 7.5、1.0 mmol/L 的 GSH、0.1 mmol/L 的 GSSG、样品浓度为 0.05 mg/L、复性温度为 4°C。图 2 展示了线性 R20A-JZTX-V 氧化还原复性的动态变化情况。随着复性时间的延长,

目的峰形逐渐变大,峰面积逐渐增加,但当复性进行至 24 h 以后,峰形在 48 h 之内都能够保持相对稳定,单一主峰明显,提示该毒素分子的复性在 24 h 内已经基本完成。复性产物经 MALDI-TOF/TOF MS 鉴定,相对分子质量为 3521.19,比线性 R20A-JZTX-V 的分子质量减少了 6,提示复性后的 R20A-JZTX-V 形成了 3 对二硫键。

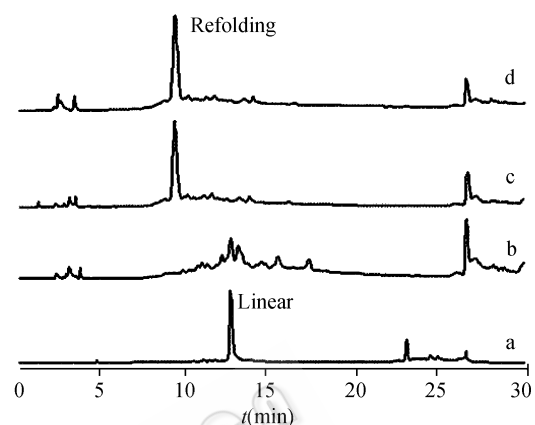


图 2 合成突变体 R20A-JZTX-V 氧化复性过程的色谱监测
Fig. 2 RP-HPLC chromatograms in oxidative refolding process of synthetic R20A-JZTX-V

Refolding time: a, 0 min; b, 10 min; c, 12 h; d, 24 h

2.3 突变体的钠通道活性分析

大鼠背根神经节细胞膜上同时存在 TTX-S 和 TTX-R 型钠通道,其分布与细胞的大小有关。其中直径小于 20 μm 的 DRG 细胞主要表达 TTX-R 型钠通道,而直径为 20~30 μm 的 DRG 细胞趋于表达 TTX-S 型钠通道^[6]。因此,我们通过倒置显微镜上的标尺附件可以选择直径小于 10 μm 或大于 30 μm 的 DRG 细胞进行实验,并在细胞外液中加入 200 nmol/L 的河豚毒素,以阻断 TTX-S 型钠电流和分离 TTX-R 型钠电流。如图 3A 所示,将 DRG 细胞钳制在 -80 mV,以 50 ms 的时程去极化到 -10 mV,可以诱发 TTX-R 型钠电流。加入 500 nmol/L 的 R20A-JZTX-V 可以抑制 TTX-R 型钠通道峰值电流的(44.2% \pm 2.3%, $n = 4$),而且这种抑制作用具有浓度依从性,其半数有效抑制浓度 IC_{50} 值为 505.3 nmol/L (图 4A)。鉴于天然 JZTX-V 分子对大鼠 DRG 细胞上 TTX-R 型钠电流的 IC_{50} 值为 27.6 nmol/L,相比之下,突变体 R20A-JZTX-V 的 IC_{50} 值约是天然 JZTX-V 的 18.3 倍,其抑制活性大大降低,表明 JZTX-V 分子中第 20 位

的精氨酸残基是负责 JZTX-V 与 DRG 细胞上 TTX-R 型钠通道结合的关键活性残基。图 3B 显示了 R20A-JZTX-V 对 DRG 细胞上 TTX-S 型钠通道的作用。加入 50 nmol/L 的 R20A-JZTX-V 可以抑制 TTX-S 型钠通道峰值电流的 $(60.9\% \pm 2.8\%, n = 3)$, 其 IC_{50} 值为 36.8 nmol/L (图 4B)。与天然 JZTX-V 对大鼠 DRG 细胞上 TTX-S 型钠电流的 IC_{50} 值 30.2 nmol/L 相比, R20A-JZTX-V 对 TTX-S 型钠通道的抑制作用与天然 JZTX-V 相当, 表明 JZTX-V 分子中第 20 位的精氨酸残基与 TTX-S 型钠通道的结合活性无关。

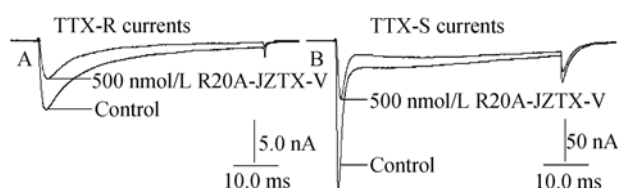


图 3 突变体 R20A-JZTX-V 对大鼠 DRG 神经元细胞上的 TTX-R 与 TTX-S 型钠电流的影响

Fig. 3 Effects of native JZTX-V and its mutant on TTX-R and TTX-S sodium currents on rat DRG neurons

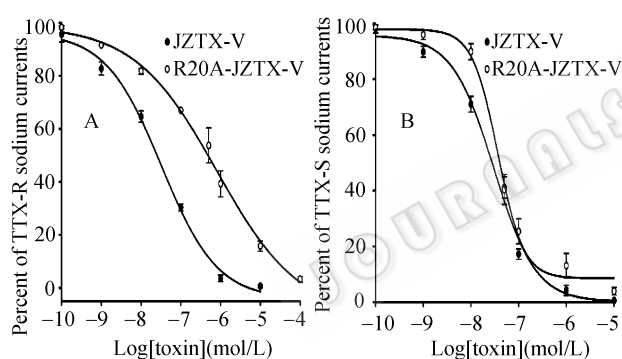


图 4 天然 JZTX-V 及其突变体对 TTX-R 与 TTX-S 型钠电流的浓度效应曲线

Fig. 4 The concentration-dependent relationship curve of native JZTX-V and its mutant on TTX-R and TTX-S sodium currents on rat DRG neurons

● presents native JZTX-V; ○ presents the mutant R20A-JZTX-V

2.4 讨论

固相多肽化学合成是开展生物毒素结构与功能关系研究的重要手段, 其研究方法包括氨基酸残基或片段的替换、删除、插入和变换等^[7]。在进行单残基替换突变时, 一般是将可能的关键残基用丙氨酸、甘氨酸或侧链基团性质差异较大的其他氨基酸残基替换。而导致突变体生物学活性减少或丧失的原因主要有三种情况: (1)被替换的残基为结构相关

残基, 它的替换导致突变体分子无法折叠复性而形成稳定的空间结构; (2)突变体复性时二硫键错配导致毒素分子本身特定的空间结构破坏; (3)被替换的残基为活性相关残基, 它的替换导致毒素分子与受体作用的位点不复存在。突变体 R20A-JZTX-V 的氧化复性研究证实当突变体的复性时间达到 12 h 后, 复性中间体已经转化为一个单一主峰, 显示突变体能够很好的折叠复性, 而质谱分析也表明复性产物形成了 3 对二硫键, 进一步的电生理活性分析发现该突变体对大鼠 DRG 细胞膜上的 TTX-S 型钠通道的抑制作用与天然 JZTX-V 相当, 说明 Arg 20 的单残基突变并未改变 JZTX-V 分子特定的空间构象。而该突变体对大鼠 DRG 细胞膜上表达的 TTX-R 型钠通道的抑制作用却比天然毒素降低了 18.3 倍但并未完全丧失, 说明第 20 位的精氨酸残基只是 JZTX-V 作用于 TTX-R 型钠通道的关键活性残基之一。因为在毒素分子中决定其生物学活性的残基往往不止一个^[8], 要想完全确定 JZTX-V 分子中的活性相关残基, 应对所有可能的活性位点进行丙氨酸扫描突变, 并通过生物学活性比较来确定, 相关研究正在继续进行中^[9]。

REFERENCES

- [1] Zhu MS, Song DX, Li TH. A new species of the family Theraphosidae, with taxonomic study on the species *Selenocosmia hainana* (Arachnida: Araneae). *Journal of Baoding Teachers College*, 2001, **14**(2): 1-6.
朱明生, 宋大祥, 李廷辉. 我国蜘蛛科一新种及海南捕鸟蛛的分类研究(蛛形纲: 蜘蛛目). 保定师专学报, 2001, **14**(2): 1-6.
- [2] Zeng XZ, Deng MC, Lin Y, *et al.* Isolation and characterization of Jingzhaotoxin-V, a novel neurotoxin from the venom of the spider *Chilobrachys Jingzhao*. *Toxicon*, 2007, **49**(3): 388-399.
- [3] John N. Wood, James P. Boorman, Kenji Okuse, *et al.* Voltage-gated sodium channels and pain pathways. *Journal of Neurobiology*, 2004, **61**: 55-71.
- [4] Xu X, Xiong X, Li DL, *et al.* Solid-phase synthesis and biological characterization of S12A-HNTX-IV and R2 9A-HNTX-IV: two mutants of haintoxin-IV. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2005, **21**(1): 92-96.
徐侠, 熊霞, 李冬玲, 等. 海南捕鸟蛛毒素-IV 突变体的固相合成和生理活性分析. 生物工程学报, 2005, **21**(1): 92-96.
- [5] Quan MH, Zeng XZ, Pi JH, *et al.* Synthesis and oxidative

- refolding of an N-terminal truncate of Jingzhao toxin-V and characterization of its activities of sodium channels. *Chinese Journal of Chromatography*, 2007, **25**(4): 501-504.
- 全妙华, 曾雄智, 皮建辉, 等. 敬钊毒素-V 剪切体 Y1-JZTX-V 的化学合成与氧化复性及其钠通道活性鉴定. 色谱, 2007, **25**(4): 501-504.
- [6] Xiao YC, Liang SP. Inhibition of neuronal tetrodotoxin-sensitive Na^+ channels by two spider toxins: hainantoxin-III and hainantoxin-IV. *European Journal of Pharmacology*, 2003, **477**(1): 1-7.
- [7] Wang XC, Liang SP. Effects of Lys13 mutation on bioactivity of HWTX-I. *Progress in Nature Science*, 2004, **14**(2): 227-231.
- 王贤纯, 梁宋平. 虎纹捕鸟蛛毒素-I Lys13 突变对生物学活性的影响. 自然科学进展, 2004, **14**(2): 227-231.
- [8] Sato K, Raymond C, Martin-Moutot N, *et al.* Binding of Ala-scanning of ω -conotoxin MVIIC to N- and P/Q-type calcium channels. *FEBS Letter*, 2000, **469**(2-3): 147-150.
- [9] Zeng XZ, Deng MC, Sun ZH, *et al.* Synthesis, refolding and characterization of JZTX-V and its effect on potassium channels. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, **24**(5): 463-468.
- 曾雄智, 邓梅春, 孙正华, 等. 敬钊毒素-V 的合成、复性及其钾通道活性鉴定. 中国生物化学与分子生物学报, 2008, **24**(5): 463-468.

科学出版社科学出版中心生物分社新书推介

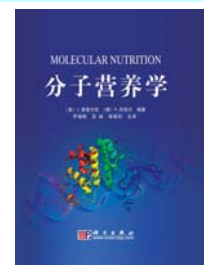
分子营养学

【美】J. 曾普尔尼 【德】H. 丹尼尔 编著
罗绪刚 吕林 李爱科 主译

978-7-03-017371-3 ¥85.00 2008年5月30日出版

分子营养学是营养学领域中发展最快的一门科学。本书是目前国内已出版的唯一一本有关分子营养领域研究进展的中文译著。书中对国际一流专家发表的有关分子营养方面的最新和最重要的研究成果进行了综述。全书共分24章, 详细叙述了分子营养学的研究方法、细胞内营养物质的动态平衡、细胞增殖和细胞凋亡、信号转导、基因表达和蛋白水解、核酸和分子水平事件的生理作用以及遗传修饰食物和食物过敏的分子机理等。

本书忠实原文, 最大限度地反映了原书的风格与韵味。可作为营养学、动物营养学、生物化学、分子生物学及医药学专业等的教学、科研人员及研究生的参考书。



登革病毒与登革病毒病

秦鄂德 秦成峰 姜涛 主编

978-7-03-021144-6 ¥79.00 2008年5月30日出版

本书介绍了登革病毒及登革病毒病。全书分为三篇共25章。第一篇详细介绍了登革病毒的分子生物学、复制增殖机制、免疫机理, 以及起源与进化等。第二篇主要介绍了登革类疾病的流行病学、临床表现和诊断, 病理学与发病机制, 治疗与疫苗, 以及传播媒介监控等。第三篇重点介绍了一些与登革病毒相关的研究方法和实验技术, 包括生物信息学和因特网资源, 反向遗传学技术, 单克隆抗体技术, 病毒的分离、检测和鉴定技术等。

本书结构严谨, 资料翔实, 内容新颖, 图文并茂, 实用性强, 融汇了编者多年来从事登革病毒研究的经验和体会, 反映了目前国内外相关研究的最新进展和成果。可作为高等院校相关专业研究生的教学参考书, 也可供科研人员、卫生防疫工作者及临床医生参考。



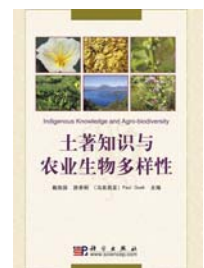
土著知识与农业生物多样性

戴陆园 游承俐 【马来西亚】Paul Quek 主编

978-7-03-020530-8 ¥55.00 2008年5月30日出版

全书以中英文两种文字较为系统地介绍了土著知识的概念, 国内外研究土著知识的概况及趋势, 国际上主要的代表性项目及相关组织机构的情况, 提出了国际热点问题——农民权问题与土著知识的关系, 阐述了土著知识收集、记录、保存、传播方法, 并以作者在云南省开展的土著知识研究课题所取得的结果为基础介绍了土著知识研究所具有的潜力, 最后论述了土著知识对农业生物多样性发展的作用和影响。

本书可供农业生物多样性和环境保护工作者、政策制订者、农业大专院校的师生及知识产权工作者等参考。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学销售中心 邮编: 100717

联系人: 周文字 联系电话: 010-64031535(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目