

海南捕鸟蛛毒素-IV 突变体的固相合成和生理活性分析

Solid-phase Synthesis and Biological Characterization of S12A-HNTX-IV and R29A-HNTX-IV: Two Mutants of Hainantoxin-IV

徐 侠, 熊 霞, 李冬玲, 肖玉成, 王贤纯*, 梁宋平*

XU Xia, XIONG Xia, LI Dong-Ling, XIAO Yu-Cheng, WANG Xian-Chun* and LIANG Song-Ping*

湖南师范大学生命科学学院, 长沙 410081

College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, China

摘 要 海南捕鸟蛛毒素-IV(HNTX-IV)是从我国海南捕鸟蛛粗毒中分离出的一种 TTX-敏感型的钠离子通道阻断剂,由 35 个氨基酸残基组成,含 3 对二硫键。为了研究 HNTX-IV 结构与功能的关系,用芴甲氧羰基(Fmoc)固相多肽合成方法合成了用丙氨酸(Ala)替代 HNTX-IV 第 12 位丝氨酸(Ser12)的突变体 S12A-HNTX-IV 和替代第 29 位精氨酸(Arg29)的突变体 R29A-HNTX-IV。合成的突变体经谷胱甘肽法氧化复性和纯化后,分别用 MALDI-TOF 质谱进行分子量鉴定,用一维核磁共振波谱法分析空间结构的变化,膜片钳电生理方法分析生物学活性。结果表明,Ser12 和 Arg29 被 Ala 突变后没有明显影响分子的空间结构,S12A-HNTX-IV 的生物学活性与天然 HNTX-IV 的相近,提示 Ser12 与 HNTX-IV 的生物学活性无关或关系不大;而 R29A-HNTX-IV 的生物学活性下降了 155 倍,说明 Arg29 是与 HNTX-IV 生物学活性相关的关键残基之一。推测 R29A-HNTX-IV 活性的降低是由于 Ala 替代 Arg 后改变了 HNTX-IV 与受体作用的位点,而不是由于毒素分子整体空间结构变化所致。

关键词 海南捕鸟蛛毒素-IV, 固相多肽合成, 突变体, 结构与功能

中图分类号 Q5 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)01-0092-05

Abstract Hainantoxin-IV (HNTX-IV) purified from the venom of the spider *Selenocosmia hainana* is a potent antagonist that acts on tetrodotoxin-sensitive (TTX-S) sodium channels. It is a 35-residue polypeptide and includes three disulfide bridges. In order to investigate the structure-function relationship of HNTX-IV, two mutants (S12A-HNTX-IV and R29A-HNTX-IV) of HNTX-IV in which Ser12 and Arg29 were replaced by Ala respectively, were synthesized by solid-phase Fmoc chemistry, followed by oxidative refolding of purified peptides under the optimal conditions. The synthetic mutants were analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry, nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and electrophysiological experiments for molecular weight, conformation and physiological activity, respectively. The results show that the mutants and native HNTX-IV (nHNTX-IV) have almost identical three-dimensional structures. The bioactivity level of S12A-HNTX-IV is also about the same as that of nHNTX-IV, suggesting that Ser12 does not play any important role for the bioactivity of this toxin. The bioactivity of R29A-HNTX-IV is reduced by at least 155 times, indicating that Arg29 is a key residue relative to the bioactivity of HNTX-IV. It is presumed that the decrease in activity of R29A-HNTX-IV is due to the changes of the property in the binding site rather than the change in the basic conformation of the molecule.

Key words Hainantoxin-IV, solid-phase synthesis, mutant, structure-function

Received: May 12, 2004; Accepted: July 12, 2004

This work was supported by Grant from National High Technology Research and Development Plan of China (No.103-13-01-06).

* Corresponding author. Tel: 86-731-8872556; E-mail: liangsp@public.cs.hn.cn; wang_xianchun@263.net

国家高技术研究发展计划项目(No.103-13-01-06)。

海南捕鸟蛛毒素-IV 是从我国海南捕鸟蛛 (*Selecocosmia hainana*) 粗毒中分离的一种肽类神经毒素。刘中华等已对其结构和性质进行了初步研究,测定了该毒素 35 个氨基酸残基的序列和 3 对二硫键的位置^[1],并实现了全化学合成^[2]。膜片钳实验表明,该毒素能在 34 nm/L 的水平上阻断河豚毒敏感 (TTX-S) 型钠离子通道^[1]。HNTX-IV 和虎纹捕鸟蛛毒素-IV (HWTX-IV) 具有很高的同源性^[1]。通过与 HWTX-IV 序列比对和活性分析,推测 HNTX-IV 第 12 位的丝氨酸和第 29 位的精氨酸可能是与 HNTX-IV 生物学活性相关的残基。本文用固相多肽合成的方法,合成 Ala 分别替代 Ser12 和 Arg29 的突变体 S12A-HNTX-IV 和 R29A-HNTX-IV,并对其空间结构的变化和生理活性进行分析,探明 Ser12 和 Arg29 与 HNTX-IV 生物学活性的关系,从而加深对 HNTX-IV 结构和功能关系的了解。

1 材料和方法

1.1 材料

9-芴甲氧羰基 (Fmoc) 氨基酸为 Millipore 公司的产品。Fmoc-PAL-PEG-PS 树脂、还原型谷胱甘肽 (GSH)、氧化型谷胱甘肽 (GSSG)、苯并三唑四甲基脲四氟硼酸盐 (TBTU)、1-羰基苯并四唑 (HOBt) 均为 Sigma 公司产品。二甲基甲酰胺 (DMF)、三氟乙酸 (TFA)、N-甲基吗啡啉 (NMM)、哌啶 (piperidine) 均为重蒸试剂。

1.2 方法

1.2.1 突变体的化学合成: 第一个氨基酸的偶联参照文献[3]的方法手工进行。第二个至最后一个氨基酸的偶联参照文献[4]的方法在 Pioneer™ 多肽合成仪上进行。合成粗品用 RP-HPLC 纯化 2 次。第一次纯化: Elite C18 柱、10 mm × 250 mm, 洗脱梯度: 0 ~ 60 min, 10% ~ 50% 0.1% TFA/乙腈溶液; 第二次纯化: Vydac C18 柱、4.6 mm × 250 mm, 洗脱梯度: 0 ~ 60 min, 10% ~ 50% 0.1% TFA/乙腈溶液。用 MALDI-TOF 质谱分析各分离峰的分子量, 确定和收集目的峰。

1.2.2 突变体的氧化复性: 参照文献[2]的方法在 Waters Alliance HPLC 系统 (Vydac C18 柱、4.6 mm × 250 mm, 洗脱梯度: 0 ~ 30 min, 15% ~ 30% 0.1% TFA/乙腈溶液) 上对不同 pH 值下的谷胱甘肽法氧化复性产率进行监测, 探索最佳氧化复性条件。各取 0.1 mg 样品加入 0.1 mmol/L Tris-HCl、0.1 mmol/L NaCl、0.5 mmol/L GSSG、5 mmol/L GSH, pH 值分别为

7.4、7.8、8.0、8.5 的缓冲溶液中, 样品浓度为 0.1 mg/L, 室温下反应, 分别于 0、2、5、10、30 min 和 1h、2h、24h 采样, 并用 50% 的 TFA 终止反应后用于分析。按照最佳复性条件扩大样品复性规模。

1.2.3 突变体的结构分析: 用核磁共振波谱法 (nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR) 分析突变体的结构: 将 2 ~ 3 mg 样品溶于 500 μL 20 mmol/L 氘代醋酸钠溶液中, 溶剂为水 (H₂O) 和重水 (D₂O) 的混合液 (9:1, V/V), 含 0.01 mmol/L EDTA (消除顺磁金属离子的影响) 及 20 mg/L NaN₃ (抑制细菌生长), 溶液 pH 值用 HCl 调至 4.0, 样品终浓度为 4 mmol/L, 最后加入 1 μL 200 μmol/L 的 TSP 作为化学位移内标。用 Bruker DRX500 核磁共振仪测定一维核磁共振谱。

1.2.4 膜片钳电生理实验: 参照文献[5]的方法急性分离并培养大鼠背根神经节 (DRG) 神经元。参照文献[6]的方法, 用慢电容在 50 pS 的较大 DRG 细胞进行突变体的河豚毒敏感 (TTX-S) 型钠通道的研究, 采用全细胞钳制 (Whole-cell patch clamp) 记录模式。电极控制仪为 Narishige PC-10 型, 钳制电极用硼酸玻璃毛细管 (美国 Fisher 公司) 二步法拉制而成, 电阻值通常为 2.0 ~ 3.0 MΩ。钳制电极 (直径为 2 ~ 3 μm) 的管内溶液 (105 mmol/L CsF、35 mmol/L NaCl、10 mmol/L HEPES、10 mmol/L EGTA, pH 7.4) 为细胞内液, 细胞浸浴液 (150 mmol/L NaCl、2 mmol/L KCl、1.5 mmol/L CaCl₂、1 mmol/L MgCl₂、5 mmol/L 葡萄糖、10 mmol/L HEPSE, pH 7.4) 为细胞外液。膜电流用 10 kHz 滤波。膜片钳放大器为 EPC-9 型。串联电阻控制在 5 MΩ 左右, 线形渗漏电流用 P/4 方法除去。

2 结果和讨论

2.1 突变体的合成效果

冷冻干燥后的突变体粗品为白色粉末, 用反相液相高效色谱 (RP-HPLC) 分离纯化 2 次, 结果见图 1。质谱分析结果表明, 图 1(A) 中保留时间为 29 min 的单一峰分子量 (MH⁺) 为 3979.71D, 与 S12A-HNTX-IV (线性) 理论分子量 3978.58D 相符; 图 (B) 中保留时间为 28.5 min 的单一峰分子量 (MH⁺) 为 3910.29D, 与 R29A-HNTX-IV (线性) 理论分子量 3909.24D 相符, 提示合成是成功的。

2.2 突变体的氧化复性

由于化学合成的多肽为线性分子, 没有生物学活性, 所以在检测其活性之前, 必须进行氧化复性使其形成正确的空间结构和二硫键配对。氧化复性是

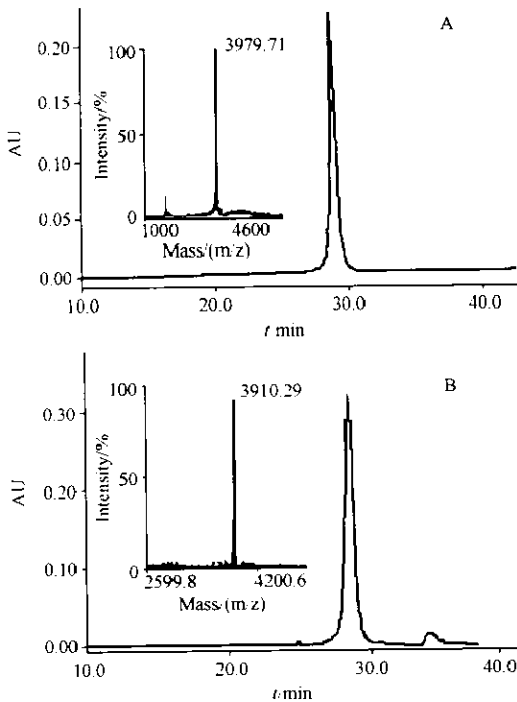


图1 突变体合成粗品的第二次纯化 HPLC 和质谱分析图谱

Fig. 1 RP-HPLC chromatograms and mass spectra of secondly purified crude synthetic mutants

(A) S12A-HNTX-IV. (B) R29A-HNTX-IV. Column: Vydac C18 column (30nm, 4.6 mm × 250mm). Buffer: (A) 0.1% TFA in water; (B) 0.1% TFA in acetonitrile. Gradient: 10% ~ 50% (B) in 60 min. Flow-rate: 0.7 mL/min. Temperature: 40 °C. Detection: 280 nm.

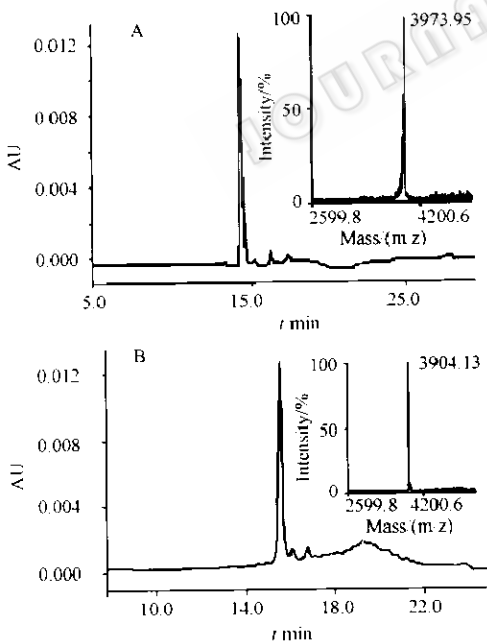


图2 复性后突变体的 RP-HPLC 和质谱分析图谱

Fig. 2 RP-HPLC chromatograms and mass spectra of refolded mutants

(A) S12A-HNTX-IV. (B) R29A-HNTX-IV. Column: Vydac C18 column (30nm, 4.5 mm × 250 mm). Buffer: (A) 0.1% TFA in water; (B) 0.1% TFA in acetonitrile. Gradient: 15% ~ 30% (B) in 30 min. Flow-rate: 0.7 mL/min. Temperature: 40 °C. Detection: 280 nm.

一个极其复杂的过程,受到很多因素的影响。所以,在进行较大规模样品的氧化复性前,需要对其最佳氧化复性条件进行摸索。

为了确定各种条件下突变体的氧化复性产率,在每种条件下用 10 μg 突变体做高效液相色谱分析,将反应 0 min 时 RP-HPLC 的峰面积作为氧化复性产率为 100% 时的峰面积,将各种条件下氧化复性的 RP-HPLC 峰面积与其比较。结果发现,反应 24h 时复性产率最高;各个 pH 值条件下的复性产率差别不大,但 pH 7.4 的复性产率略好于其他条件下的复性产率。综合比较可知,5 mmol/L GSH、0.5 mmol/L GSSG、0.1 mmol/L Tris、0.1 mmol/L NaCl, pH 7.4 是氧化复性的最佳反应条件。

在上述条件下进行了较大量样品的氧化复性(图 2)。经质谱鉴定, S12A-HNTX-IV 和 R29A-HNTX-IV 复性产物的分子量 (MH⁺) 分别为 3973.95D 和 3904.13D, 比线性分子 (3978.71D 和 3909.29D) 少 6

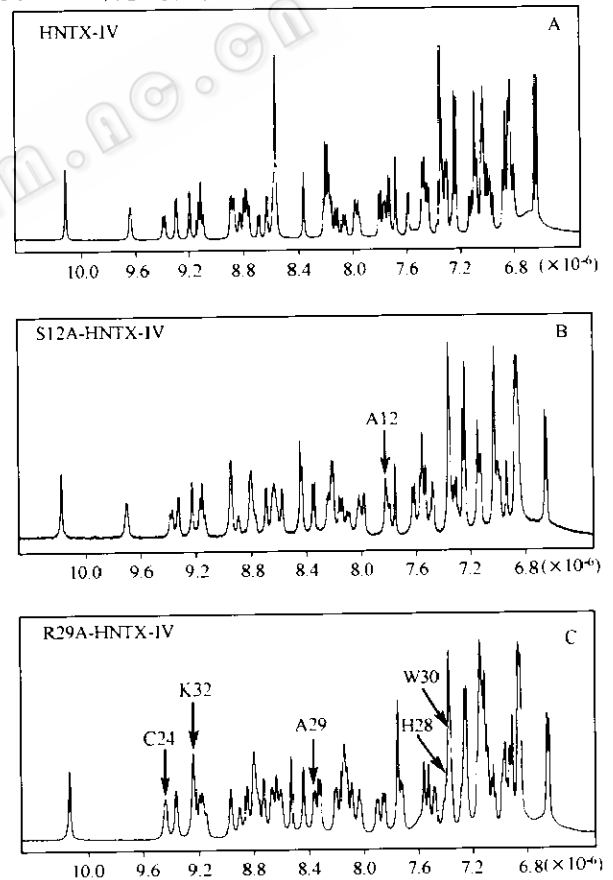


图3 天然 HNTX-IV 及其突变体的一维核磁图谱

Fig. 3 NMR spectra of native HNTX-IV and its mutants (A) native HNTX-IV; (B) S12A-HNTX-IV; (C) R29A-HNTX-IV. The chemical shift of the residues that were different from those of native toxin were indicated in the figure by arrow.

个质子,说明6个半胱氨酸形成了3对二硫键。

2.3 突变体的空间结构分析

核磁共振谱能提供诸如化学位移、质子的裂分峰数、偶合常数以及各组峰的积分高度等参数。这些参数与有机化合物的结构有着密切的关系。因此,核磁共振谱是鉴定有机化合物结构的重要工具之一。本实验应用一维核磁共振波谱法鉴定 S12A-HNTX-IV 和 R29A-HNTX-IV 的空间结构。图3显示了天然毒素 HNTX-IV (nHNTX-IV) 和两个突变体分子的 $1D^1H-NMR$ 谱图的酰胺质子区域。可以看出 S12A-HNTX-IV 的谱图和 nHNTX-IV 的谱图非常相似,说明它们具有相似的分子折叠方式, Ser12 被 Ala 替换后没有引起分子空间结构的明显变化,也提示 S12A-HNTX-IV 氧化复性后形成了正确的二硫键配对。R29A-HNTX-IV 的谱图与 nHNTX-IV 的谱图比较具有一些局部差异,可能是因为多肽分子中一个氨基酸残基的替换引起了分子中某些质子的化学环境的改变,从而导致这些质子的化学位移值发生变化(图中箭头所指的为化学位移发生变化的残基)。但本实验室的李冬玲博士解析出了 nHNTX-IV 和

R29A-HNTX-IV 的溶液三维结构,发现两者极为相似,同为 ICK 结模体(结果待发表)。这说明 Arg29 被 Ala 替代后并未明显影响分子的整体空间结构,同时也说明 R29A-HNTX-IV 的3对二硫键正确配对。

2.4 电生理实验

由于直径较大的 DRG 细胞趋向于表达快的河豚毒敏感(TTX-S)型钠离子通道^[7],所以选用直径在 $20 \sim 40 \mu m$ 的 DRG 细胞进行钠离子通道的研究。图4表明在全细胞钳制记录模式下,天然毒素及其突变体在 $1.0 \mu mol/L$ 浓度下都表现出一定的生物学活性。它们的 IC_{50} 值如图5所示, S12A-HNTX-IV ($IC_{50} = 58.3 nmol/L$) 对钠电流的阻断作用与天然 HNTX-IV ($IC_{50} = 44.6 nmol/L$) 分子基本相当,而 R29A-HNTX-IV ($IC_{50} = 6.93 \mu mol/L$) 分子则比天然毒素分子活性下降了两个数量级,活性下降了155倍。由此可见,Arg29 是与 HNTX-IV 生物学活性相关的重要残基之一。

毒素或其突变体的生物学活性可以通过小白鼠膈神经-膈肌标本的神经肌肉接头阻断实验从组织

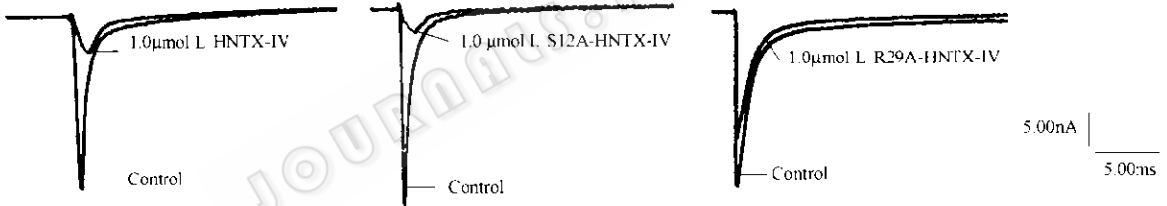


图4 天然 HNTX-IV 及其突变体对大鼠 DRG 神经元的 TTX-S 型 Na^+ 电流的作用

Fig. 4 Effects of native HNTX-IV and its mutants on TTX-S sodium currents on rat DRG neurons

(A) native HNTX-IV; (B) S12A-HNTX-IV; (C) R29A-HNTX-IV.

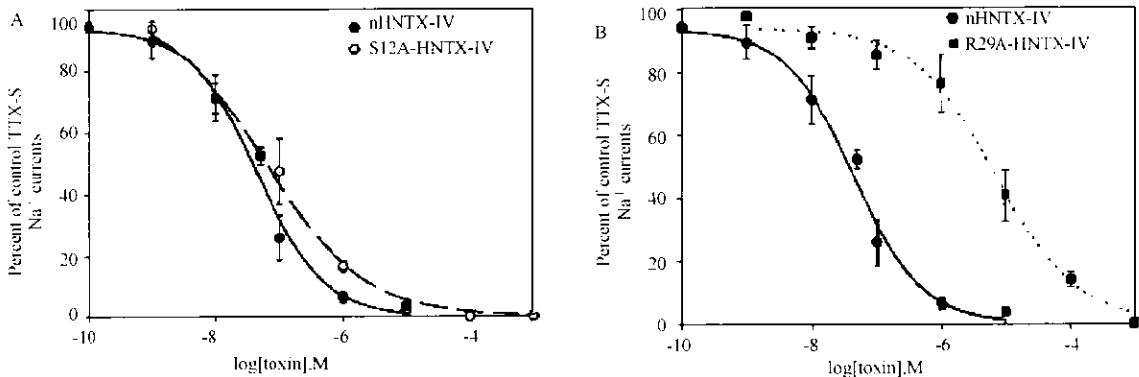


图5 HNTX-IV 及两个突变体对 TTX-S 型钠电流的浓度效应曲线

Fig. 5 The concentration-dependent blockage of native HNTX-IV and its mutants on TTX-S sodium currents on rat DRG neurons. They were applied at doses from $1 nmol/L$ to $100 \mu mol/L$ with a tenfold increment. (A) S12A-HNTX-IV; (B) R29A-HNTX-IV.

水平上来检测^[2,4,7-10],也可以采用膜片钳技术^[1,6,11-12]从细胞水平上进行检测。膜片钳技术法更能真实地反映突变体的活性变化,而且,用 Pulse/Pulsefit 8.0 软件(HEKA Electronics, Germany)收集、分析和记录数据,得到的图谱具有直观性。图 4 显示出 S12A-HNTX-IV 对 Na⁺ 电流的阻断比 R29A-HNTX-IV 大得多;而从图 5 可以看出突变体与天然毒素相似^[1],都具有浓度依从性,R29A-HNTX-IV 的活性比 S12A-HNTX-IV 的活性变化大。

综上所述,Ser12 和 Arg29 分别突变为 Ala 后并未明显影响毒素分子的整体空间结构,R29A-HNTX-IV 生物学活性的降低并不是由于分子整体空间结构的变化,而可能是 Ala 替代 Arg29 后导致毒素分子与受体作用的位点发生变化。所以,可以认为 Ser12 与 HNTX-IV 生物学活性无关或关系不大,而 Arg29 却是 HNTX-IV 发挥生物学活性所必需的关键残基之一。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Liu ZH, Dai J, Chen ZR *et al.* Isolation and characterization of hainantoxin-IV, a novel antagonist tetrodotoxin-sensitive sodium channels from the Chinese bird spider *Selenocosmia hainana*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2003, **60**: 1 - 7
- [2] Liu ZH(刘中华), Chen P(陈平), Liang SP(梁宋平). Synthesis and oxidative refolding of hainantoxin-IV. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*(生物化学与生物物理学报), 2002, **34**(4): 516 - 519
- [3] Liang SP(梁宋平). *An Experimental Course in Biochemistry and Molecular Biology*. 1st ed. Beijing: Higher Education Press, 2003
- [4] Wang XC(王贤纯), Liang SP(梁宋平), Luo ZM(罗泽民).

- Chemical synthesis and characterization of R20A-HWTX-I, a mutant of huwentoxin-I with single residue replacement. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2000, **16**(4): 111 - 115
- [5] Wang QW, Li Q, Li ZW. Inhibitory effects of clonidine on GABA-activated currents in DRG neurons. *Acta Physiol Sin*, 1998, **50**: 19 - 27
- [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 - 7
- [7] Roy ML, Narahashi T. Differential properties of tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci*, 1992, **12**: 2104 - 2111
- [8] Wang XC(王贤纯), Liang SP(梁宋平), Luo ZM(罗泽民). Solid-phase synthesis and bioactivity analysis of A1Y-HWTX-I: a mutant of huwentoxin-I. *Chin J Biochem Mol Biol*(中国生物化学与分子生物学报), 2000, **16**(3): 357 - 362
- [9] Wang XC(王贤纯), Liang SP(梁宋平), Luo ZM(罗泽民). Chemical synthesis and physiological activity analysis of K3A-HWTX-I: A mutant of huwentoxin-I. *Life Science Research*(生命科学研究), 1998, **2**(2): 87 - 92
- [10] Chen ZR(陈冉冉), Wang XC(王贤纯), Liang SP(梁宋平). Synthesis, folding and bioactivity analysis of K27A-HWTX-IV: A mutant of the TTX-sensitive sodium channel inhibitor. Huwentoxin-IV. *Jour Nat Sci Hunan Norm Univ*(湖南师范大学自然科学学报), 2003, **26**(3): 67 - 72
- [11] Peng K, Shu Q, Liu ZH *et al.* Function and solution structure of huwentoxin-IV, a potent neuronal tetrodotoxin(TTX)-sensitive sodium channel antagonist from Chinese bird spider *Selenocosmia huwena*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, **277**(49): 47564 - 47571
- [12] Xiao YC, Liang SP. Purification and characterization of Hainantoxin-V, a tetrodotoxin-sensitive sodium channel inhibitor from the venom of the spider *Selenocosmia hainana*. *Toxicol*, 2003, **41**: 643 - 650