

虎纹捕鸟蛛毒素 XI (HWTX-XI) 突变体的真核表达及活性鉴定

王凡, 王小娟, 宁蔚文, 刘中华

湖南师范大学生命科学学院 蛋白质组学和发育生物学国家教育部重点实验室, 长沙 410081

摘要: 虎纹捕鸟蛛毒素-XI (HWTX-XI) 是从虎纹捕鸟蛛粗毒中分离的含 55 个氨基酸残基的蛋白质, 兼有胰蛋白酶抑制活性和电压门控钾离子通道抑制活性。通过突变 HWTX-XI 上的钾离子通道抑制活性关键氨基酸残基设计了 2 个突变体 (分别突变以下氨基酸残基: R₅I, R₁₀T, R₂₅A 和 R₅I, R₂₅A), 利用 pVT102U/ α 表达载体在酿酒酵母 S78 中成功表达并获得了高纯度的重组蛋白质; 通过分光光度计比色法、膜片钳技术和小鼠脑室注射分别比较三者的胰蛋白酶和钾通道抑制活性以及动物毒性, 结果显示: HWTX-XI 突变体与 HWTX-XI 有相同胰蛋白酶抑制活性, 但其钾通道活性降低约 30 倍; 小鼠脑室注射 HWTX-XI 的半致死剂量为 247.3 μ g/kg 体重, 而突变体在剂量达到 25 mg/kg 时仍未见明显毒性反应。获得了胰蛋白酶抑制活性保留, 但钾通道抑制活性和动物毒性大大降低的突变体, 为 HWTX-XI 胰蛋白酶抑制活性的应用奠定了基础。

关键词: 虎纹捕鸟蛛毒素 XI, 真核表达, 突变体, 胰蛋白酶抑制活性, 钾离子通道抑制活性

Expression and characterization of Huwentoxin-XI (HWTX-XI) and its mutants

Fan Wang, Xiaojuan Wang, Weiwen Ning, and Zhonghua Liu

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

Abstract: Huwentoxin-XI (HWTX-XI) is a protein isolated from the crude venom of spider *Ornithoctonus huwena*. It has 55 amino acid residues containing 6 cysteine residues forming 3 disulfide bonds. It shows potent inhibitory effect on trypsin and voltage-gated potassium channels in rat dorsal root ganglion cells. According to the structure-function relationship of HWTX-XI, we designed two mutants through mutation of potassium channel inhibition related amino acid residues (R₅I, R₁₀T, R₂₅A and R₅I, R₂₅A) and then expressed them with high purity by using the vector pVT102U on *Saccharomyces cerevisiae* strain S78; The two mutants had the same trypsin inhibition activity as HWTX-XI, whereas their potassium channel inhibition activity and animal toxicity were much lower than those of HWTX-XI. This study is helpful for designing drugs of trypsin related diseases based on HWTX-XI.

Keywords: HWTX-XI, mutant, eukaryotic expression, trypsin inhibition activity, potassium channel inhibition activity

Received: June 21, 2010; **Accepted:** September 25, 2010

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30700127), Hunan Provincial Natural Science Foundation of China (No. 08JJ3087).

Corresponding author: Zhonghua Liu. Tel: +86-731-8872556; Fax: +86-731-8861304; E-mail: liuzh@hunnu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 30700127), 湖南省自然科学基金 (No. 08JJ3087) 资助。

虎纹捕鸟蛛毒素 XI(HWTX-XI) 是从蜘蛛毒素中新发现的一种毒素, 由 55 个氨基酸残基组成, 含 3 对二硫键, 属于 BPTI/Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂家族; HWTX-XI 的胰蛋白酶抑制活性强于牛胰蛋白酶抑制剂 BPTI, 是目前世界上发现的最强的多肽类胰蛋白酶抑制剂, 初步药理学实验表明 HWTX-XI 在动物急性胰腺炎模型上具有较好的疗效^[1]。然而, HWTX-XI 对于电压门控钾通道具有一定抑制活性, 在整体动物水平表现出较弱的神经毒性。因此通过引入氨基酸突变^[2], 降低 HWTX-XI 的钾离子通道活性, 将减弱其毒副作用, 进一步提升利用 HWTX-XI 进行药物研发的应用前景。

根据前期结构与功能关系研究可知: 与 HWTX-XI 两种生物学活性相关的功能位点在其分子表面具有相对独立性。其中 Lys14 是 HWTX-XI 胰蛋白酶在抑制活性的关键残基, Lys14 突变为 Ala 使多肽分子的酶抑制活性丧失, 但其钾离子通道抑制活性未受影响; 与 Lys14 靠近的氨基酸残基对于其胰蛋白酶活性具有一定作用, 但影响不大, 其中 Arg10 突变为含羟基氨基酸残基 Thr 可使 HWTX-XI 的胰蛋白酶抑制活性少许上升。HWTX-XI 的离子通道活性位点在 N-端螺旋和在空间上与之邻近的 β -转角 2 个区域, 其中第 5 位 Arg 突变为 Ile 以及第 25 位 Arg 突变为 Ala 均导致钾离子通道活性降低。根据以上结论设计 HWTX-XI 的 2 个突变体 (mut1 和 mut2), 野生型 HWTX-XI 和 2 个突变体的氨基酸序列如图 1 所示。

```
HWTX-XI  IDTCR5LPSDR10GRCKASFERWYFNGR25TCAKF IYGGCGGNGNKFPQTQEACMKRCAKA
mut1:    IDTCL5LPSDRT10GRCKASFERWYFNGA25TCAKF IYGGCGGNGNKFPQTQEACMKRCAKA
mu2:     IDTCI5LPSDRGRCKASFERWYFNGA25TCAKF IYGGCGGNGNKFPQTQEACMKRCAKA
```

图 1 HWTX-XI 及其突变体的氨基酸序列 (HWTX-XI 中红色标记的氨基酸残基分别突变为两个突变体 mut1 和 mut2 中相应的氨基酸残基红色标记)

Fig. 1 Amino acid sequence of HWTX-XI and its mutants. The residues labeled with red in two mutants (mut1 and mut2) are the mutated residues.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒

酿酒酵母菌 S78 (*Saccharomyces cerevisiae* Strain S78)、酵母穿梭质粒 pVT102U/ α ^[4-5]和大肠杆菌 TOP10 均为本实验室保存。

1.1.2 培养基

YSD 培养基: Yeast Nitrogen Base 6.7 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 亮氨酸 200 mg/L, 腺嘌呤 100 mg/L, 肌醇 200 mg/L, 112 °C 灭菌 20 min; YSD 固体培养基: 100 mL YSD 培养液加琼脂粉 1.5 g; YPD 培养基: 酵母浸出物 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 112 °C 灭菌 20 min; YPD 固体培养基: 100 mL YPD 培养液加琼脂粉 1.5 g。

1.1.3 试剂和仪器

Taq 酶购自 MBI Fermentas 公司。蛋白胨购自上海生工生物工程有限公司。酵母浸出物购自 Oxoid 公司。 α -氰基-4-羟基肉桂酸 (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, CCA)、三氟乙酸 (TFA)、胰蛋白酶 (Trypsin) 均为 Sigma 产品。其他为国产分析纯试剂。ProFLEXTMIII 型 MALDI-TOF(Matrix-assisted Laser desorption/ionization-time-of-flight) 质谱仪购自 Bruker 公司。Waters650E 型 HPLC 系统 (486UV 检测器, millennium 色谱工作站)。Waters HPLC workstation (515pump, 2487UV 检测器)。PCR 仪购自 Bio-RAD 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计

PCR引物根据pVT102U/ α -HWTX-XI-R₂₅A序列设计并由金斯特公司合成,采用反向PCR从pVT102U/ α -HWTX-XI-R₂₅A质粒扩增目的片段(大小约200 bp),引物中设计引入突变位点。引物序列如表1所示。

表1 HWTX-XI突变体的引物序列

Table 1 Primer sequence of HWTX-XI mutants

Primer name	Primer sequence (5'-3')
HWTX-XI-mut1-Forward	CGTCTAGATAAGAGAATAGATA CATGCATCTTGCCCTCTGACACT GGGAG
HWTX-XI-mut1-Reverse	CCGAAGCTTATGCTTTTGCACA TCTTTTCATG
HWTX-XI-mut2-Forward	CGTCTAGATAAGAGAATAGATA CATGCATCTTGCCC
HWTX-XI-mut2-Reverse	CCGAAGCTTATGCTTTTGCACA TCTTTTCATG

PCR反应条件为:94℃预变性5 min;94℃变性1 min,63℃退火1 min,72℃延伸1 min,30个循环;最后72℃延伸5 min。

1.2.2 重组质粒的构建

经PCR扩增出来的突变体基因采用Promega的PCR产物回收试剂盒回收,然后用*Xba*I和*Hind*III双酶切16 h,再使用PCR产物回收试剂盒回收,2.0%的琼脂糖凝胶进行核酸定量。与此同时,pVT102U载体也采用*Xba*I和*Hind*III双酶切16 h,并经琼脂糖凝胶电泳分离后,用胶回收试剂盒回收。取2 μ L载体片段和6 μ L酶切后的PCR片段在12 μ L体系中进行连接,16℃过夜,次日转化TOP10感受态细胞,然后采用*Xba*I和*Hind*III双酶切筛选阳性克隆。测序正确的载体命名为pVT-HWTX-XI-mut1和pVT-HWTX-XI-mut2。

1.2.3 基因转化

酵母感受态细胞的制备:S78 YPD平板于30℃培养2~3 d,挑单克隆于3 mL YPD溶液中,30℃振荡培养12 h。取2个1.5 mL离心管(灭菌),各放

1 mL菌液,4 000 r/min离心5 min。细胞悬于1 mL灭菌ddH₂O中,4 000 r/min离心5 min。倒去上清,细胞悬浮于1 mL混合溶液中(10 \times TE, 1 mol/L LiAc, ddH₂O,以1:1:8的体积比混合)。质粒的转化:将表达载体质粒pVT-HWTX-XI-mut1(mut2) 1.0 μ g; Carrier DNA 10 μ g; 上述菌悬液20 μ L; PEG溶液(10 \times TE, 1 mol/L LiAc, 50% PEG4000,以1:1:8的体积比混合)1 mL加入1.5 mL无菌管中,混合,30℃、200 r/min培养30 min。42℃热击15 min后,5 000 r/min离心5 min,弃上清,细胞沉淀用200 μ L 1 \times TE洗涤,5 000 r/min离心5 min,弃上清,细胞沉淀悬浮于200 μ L 1 \times TE溶液中,细胞悬浮液涂YSD板,30℃培养4~6 d。

1.2.4 蛋白质的表达

挑取YSD板上直径为0.5~1 mm菌斑于25 mL YSD溶液中,30℃、250 r/min培养24 h,然后以1:30的比例转入750 mL YPD溶液中,30℃、250 r/min扩大培养3~4 d。

1.2.5 蛋白质的纯化与鉴定

将培养的菌液在4℃、11 000 r/min条件下离心20 min,取上清,然后用抽滤瓶抽滤,得到样品。用2个柱体积的平衡液(0.1 mol/L NaAc pH 4.2)平衡CM-Sepharose阳离子交换柱,将表达上清上样,上样完毕后用10个柱体积的平衡液冲洗,去除色素。采用分步洗脱的方法,依次用含0.1、0.2、0.5、1 mol/L NaCl的0.1 mol/L NaAc(pH 4.2)缓冲液进行洗脱。收集每个洗脱峰,把含有目的蛋白质的洗脱峰进一步脱盐反相纯化。取5 μ L洗脱峰溶液和5 μ L饱和的CCA溶液混合,然后取1 μ L点样,待样品自然干燥后上STR MALDI-TOF质谱仪进行质谱鉴定^[3]。

1.2.6 分光光度计法检测HWTX-XI突变体的胰蛋白酶抑制活性

HWTX-XI及其突变体溶于双蒸水中,胰蛋白酶溶于0.001 mol/L的盐酸,底物BAPNA先在80℃的双蒸水中溶解,然后快速冷却至室温,防止

BAPNA 的再结晶。准确定量的胰蛋白酶抑制活性测定采用传统的分光光度计的方法进行^[4]。反应的缓冲液为 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.1), 20 mmol/L CaCl₂, 0.05% triton X-100, 反应时取 100 μ L 反应缓冲液和不同体积的 HWTX-XI 突变体 (1×10^{-5} mol/L) 相混合, 然后加入 10 μ L 胰蛋白酶, 并用缓冲液补齐抑制剂体积的差异, 再次混匀后, 室温静置 15 min, 使之相互作用, 然后加入 30 μ L 底物 (1.2 mmol/L), 残余的胰蛋白酶即和底物反应, 反应 5 min 后加入 10 μ L 60% 乙酸终止反应, 然后在 405 nm 的波长下检测吸收值, 可用于计算抑制剂的动力学常数^[4]。

1.2.7 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^[5]。玻璃电极经两步拉制后热抛光, 所得电极尖端口径为 1.5~2.0 μ m, 充电极内液后入水电阻为 2~4 M Ω ^[6]。用于钾电流记录的细胞外液为: 130 mmol/L 氯化胆碱, 5 mmol/L KOH, 12 mmol/L D 型葡萄糖, 2 mmol/L MgCl₂, 2 mmol/L CaCl₂, 10 mmol/L HEPES, pH 为 7.40。电极内液为: 120 mmol/L 氟化钾, 20 mmol/L NMG, 10 mmol/L HEPES, 10 mmol/L EGTA, 2 mmol/L MgATP, 0.5 mmol/L Li₂GTP, pH 为 7.4。实验细胞形成全细胞记录模式后稳定 4~6 min。记录电流经 PEC-10 放大器 (HEKA, German) 10 KHz 滤波过滤。数据和图形用 pulsefit+pulse 8.0 软件采集分析^[7]。

1.2.8 小鼠脑室注射

脑室注射 (Intracerebroventricular, icv) 给药用去头皮法^[8]。昆明种小鼠雌雄各半, 体重 18~22 g, 分为 6 组, 每组 8 只; 野生型 HWTX-XI 及其突变体以生理盐水 15 μ L 溶解, 分别以 562.5、375、250、165、110 μ g/kg 的剂量注射; 注射前对小鼠实施乙醚麻醉, 以两耳连线的中点为中心剪去皮肤约 5 mm \times 5 mm, 实验时在矢状缝和人字缝交点一侧 1~2 mm 间用微量注射器注入药液 15 μ L, 注射完后立即观察动物反应, 观察 48 h; 统计小鼠死亡比例, 并按改良寇氏法公式计算野生型 HWTX-XI 的 LD₅₀ 值。

2 结果

2.1 重组蛋白质在酿酒酵母中的表达及分离纯化

HWTX-XI 两个突变体基因均以 PCR 的方法获得, 大小约 190 bp, 克隆至表达质粒 pVT102U, 经过阳性克隆筛选、测序获得了突变成功的 2 个突变体重组表达质粒: pVT-HWTX-XI-mut1 和 pVT-HWTX-XI-mut2; 并利用酿酒酵母 S78 菌株表达 2 个突变体及其 HWTX-XI。该表达系统属于组成型表达, 表达的产物分泌到培养液中, 这对于目标产物的分离纯化有利^[9-11]。利用该表达系统, 本实验室成功地表达了多个蜘蛛多肽毒素, 并且证明结合阳离子交换 (CM-Sepharose) 和反相-HPLC 分离, 可获得高纯度目标产物^[12]。图 2 为 HWTX-XI 及其 2 个突变体经过离子交换分离后进一步采用反相-HPLC 分离的色谱图, 野生型 HWTX-XI 反相-HPLC 洗脱的乙腈浓度与天然 HWTX-XI 相似, 而 2 个突变体的乙腈洗脱浓度分别高于野生型, 这与 2 个突变体分别将极性氨基酸残基 Arg 突变为非极性氨基酸 Ile 相符。质谱分析显示野生型反相-HPLC 色谱图主峰的分子量与天然 HWTX-XI 相同, Edman 降解测定 N-端序列也完全相同; 2 个突变体的质谱测定分子量也与理论分子量相同 (图 2)。以上结果表明通过酿酒酵母表达系统成功地表达了重组 HWTX-XI 及其 2 个突变体 (HWTX-XI-mut1 和 HWTX-XI-mut2), 且获得了纯度较高的目的产物。

2.2 HWTX-XI 及其突变体的胰蛋白酶抑制活性比较

利用分光光度计比色方法, 测定了 HWTX-XI 及其突变体对胰蛋白酶的抑制作用, 并用双倒数法得到了它们与胰蛋白酶抑制的平衡常数。如表 2 所示, 野生型 HWTX-XI 对胰蛋白酶的抑制常数为 8.9×10^{-8} mol/L, HWTX-XI-mut1 和 HWTX-XI-mut2 对胰蛋白酶的抑制常数与野生型的在同一数量级。该结果与预期相符, 因为 2 个突变体的突变位点不是 HWTX-XI 作为胰蛋白酶抑制剂的关键活性残基, 因此其胰蛋白酶抑制活性未受到影响。

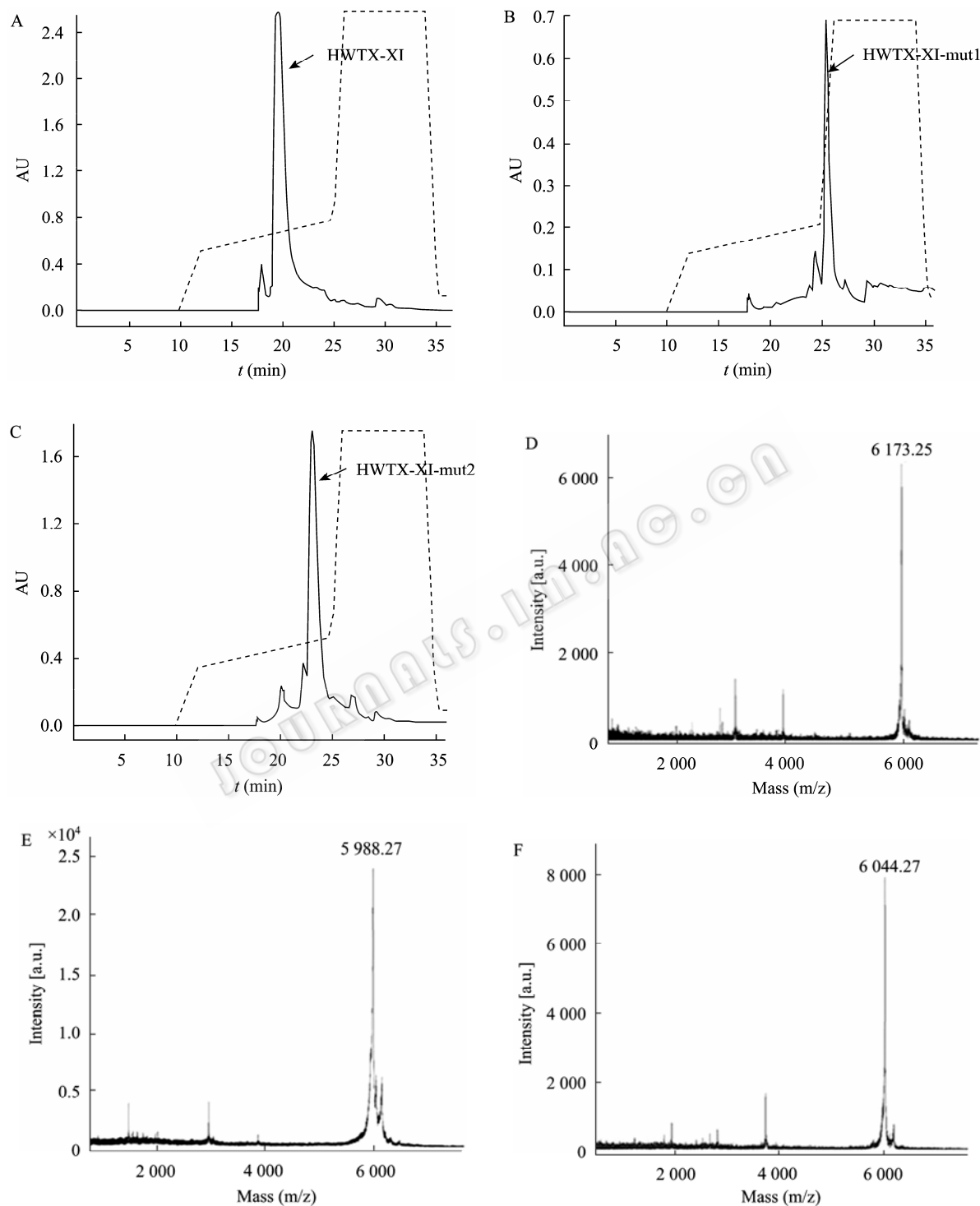


图2 HWTX-XI及其突变体反相-HPLC分离和质谱分析图谱

Fig. 2 RP-HPLC chromatogram and mass spectra of HWTX-XI and the two mutants. (A–C) RP-HPLC chromatogram of HWTX-XI, HWTX-XI-mut1, HWTX-XI-mut2. (D–F) Mass spectra of native HWTX-XI, HWTX-XI-mut1 and HWTX-XI-mut2.

表 2 野生型 HWTX-XI 及其突变体与胰蛋白酶作用的抑制常数

Table 2 The bind parameters of HWTX-XI and its mutants to trypsin

Protein	Ki (mol/L)
HWTX-XI	8.9e-8
HWTX-XI-mut1	1.8e-8
HWTX-XI-mut2	2.3e-8

2.3 HWTX-XI 及其突变体钾通道抑制活性比较

通过膜片钳检测表明, HWTX-XI 及其突变体对大鼠 DRG 细胞上钾通道电流均有部分抑制作用 (图 3)。野生型 HWTX-XI 在 10 $\mu\text{mol/L}$ 时可抑制 60% 钾通道电流, 根据其浓效曲线推测 IC_{50} 值为 3.92 $\mu\text{mol/L}$ (图 3A); HWTX-XI-mut1 和 HWTX-XI-mut2 在 10 $\mu\text{mol/L}$ 时抑制约 30% 钾通道电流, 继续增加浓度至 100 $\mu\text{mol/L}$, 抑制率仍低于 50%, 推测 2 个突

变体的 IC_{50} 值超过 100 $\mu\text{mol/L}$ (图 3B、3C)。该结果说明通过突变 HWTX-XI 钾通道抑制活性关键氨基酸残基, 从而获得了钾通道抑制活性大大降低的突变体, 其钾通道抑制活性约降低 30 倍。

2.4 HWTX-XI 及其突变体小鼠脑室注射毒性比较

利用小鼠脑室注射, 进一步评价了 HWTX-XI 及其突变体的动物毒性。昆明种小鼠脑室注射 HWTX-XI 后, 1 min 内表现出极度兴奋、剧烈奔跑、翻滚等现象, 严重的全身抽搐, 最后衰竭而死, 症状较轻微的也需 48 h 才能恢复。求出 HWTX-XI 小鼠脑室注射的半数致死剂量 LD_{50} 值为 247.34 $\mu\text{g/kg}$; 而小鼠脑室注射 2 个 HWTX-XI 突变体在剂量达到 25 mg/kg 时未见明显毒性反应, 可见氨基酸突变大大降低了动物毒性, 该实验结果与膜片钳实验结果相吻合。

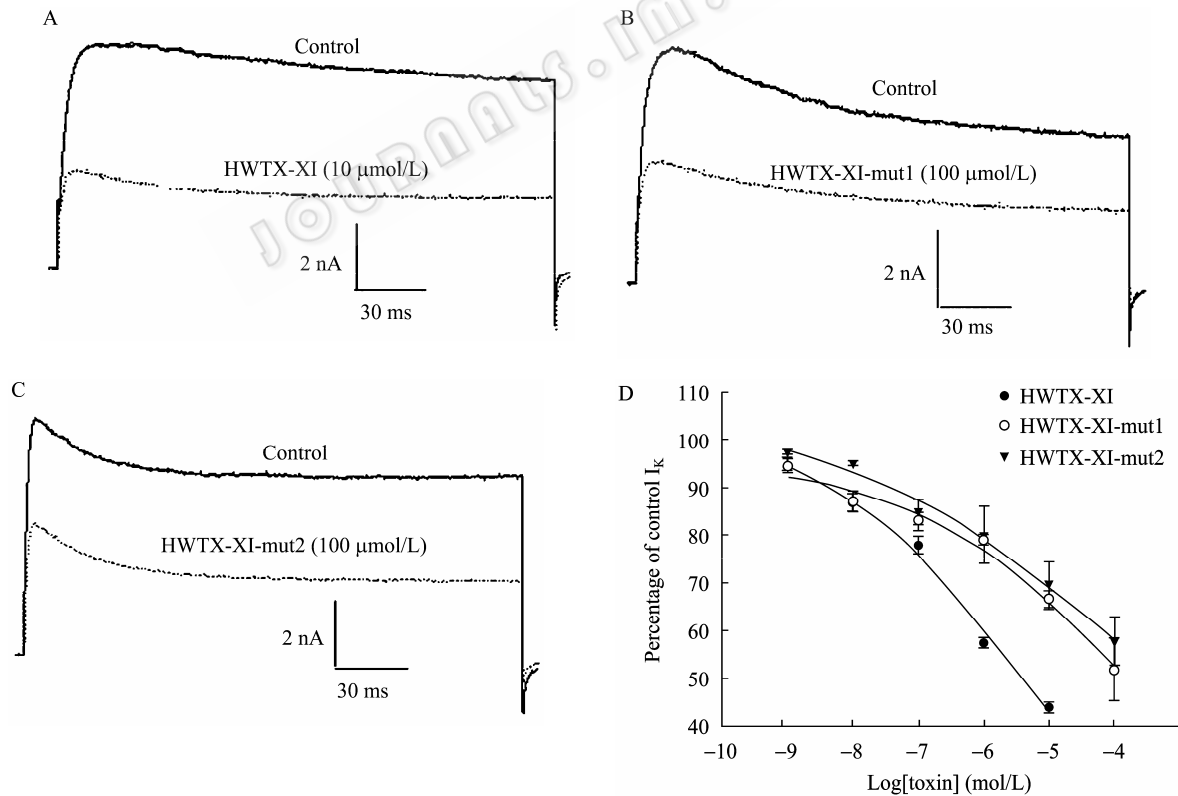


图 3 HWTX-XI 及其突变体对大鼠 DRG 细胞电压敏感钾通道电流的抑制作用

Fig. 3 Inhibition of HWTX-XI and its mutants on voltage-gated potassium channels on rat DRG cells (A-C) and the concentration-response relationship (D).

本研究在前期结构与功能研究基础上, 通过突变 HWTX-XI 钾通道抑制活性的关键氨基酸残基, 设计了 2 个突变体, 并利用 pVT102U 表达载体和酿酒酵母 S78 菌株成功表达了 HWTX-XI-mut1 和 HWTX-XI-mut2 两个突变体。胰蛋白酶抑制活性、钾通道抑制活性和动物毒性比较表明 2 个突变体具有与 HWTX-XI 相同强度的胰蛋白酶抑制活性, 而其钾通道抑制活性大大降低, 从而大大减弱了动物毒性。本研究进一步证明了 HWTX-XI 分子双功能位点的相对独立性, 并为 HWTX-XI 胰蛋白酶抑制活性的应用奠定了基础^[13-14]。

REFERENCES

- [1] Yuan CH, He QY, Peng K, et al. Discovery of a distinct superfamily of kunitz-type toxin (KTT) from Tarantulas. PLoS ONE, 2008, 3(10): e3414.
- [2] Wu JJ, He LL, Zhou Z, et al. Gene expression, mutation, and structure-function relationship of scorpion toxin BmP05 action on SK_{ca} channels. Biochemistry, 2002, 41(8): 2844-2849.
- [3] Chen JJ, Zhang YQ, Rong MQ, et al. Expression and characterization of jingzhaotoxin-34, a novel neurotoxin from the venom of the tarantula *Chilobrachys jingzhao*. Peptides, 2009, 30(6): 1042-1048.
- [4] Liang SP. Experimental Course of Biochemistry and Molecular Biology. Beijing: Higher Education Press, 2003: 48-54.
梁宋平. 生物化学与分子生物学实验教程. 北京: 高等教育出版社, 2003: 48-54.
- [5] Wang MC, Guan X, Liang SP. The cross channel activities of spider neurotoxin huwentoxin-I on rat dorsal root ganglion neurons. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 357(3): 579-583.
- [6] Xiao YC, Tang JZ, Yang YJ, et al. Jingzhaotoxin-III, a novel spider toxin inhibiting activating of voltage-gated sodium channel in rat cardiac myocytes. J Biol Chem, 2004, 279(25): 26220-26226.
- [7] Xiao YC, Tang JZ, Hu WJ, et al. Jingzhaotoxin-I, a novel spider neurotoxin preferentially inhibiting cardiac sodium channel inactivation. J Biol Chem, 2005, 280(13): 12069-12076.
- [8] Chen WY, Li BH, Wu HY. Inhibition of defecation caused by morepinephrine and intracerebroventricular injection of methoxamine in mice. Chin J Pharmacol Toxicol, 1995, 9(4): 277-279.
陈蔚云, 李宝华, 吴海燕. 去甲肾上腺素和脑室注射甲氧明引起的小鼠排便抑制. 中国药理学与毒理学杂志, 1995, 9(4): 277-279.
- [9] Wang CG, Gilles N, Hamon A, et al. Exploration of the functional site of a scorpion α -like toxin by site-directed mutagenesis. Biochemistry, 2003, 42(16): 4699-4708.
- [10] Peng K, Lin Y, Liang SP. Nuclear magnetic resonance studies on huwentoxin-XI from the Chinese bird spider *Ornithoctonus huwena*: 15N labeling and sequence-specific 1H, 15N nuclear magnetic resonance assignments. Acta Biochim Biophys Sin, 2006, 38(7): 457-466.
- [11] Li J, Ruan KC, Chi CW, et al. The assignment of the reactive sites of the double-headed arrowhead proteinase inhibitor A and B. Acta Biochim Biophys Sin, 2002, 34(5): 662-666.
- [12] Jiang LP, Peng L, Zhang YQ, et al. Expression, purification and characterization of a group of lectin-like peptides from the spider *Ornithoctonus huwena*. Peptides, 2009, 30(4): 669-674.
- [13] Kitagawa M, Hayakawa T. Antiproteases in the treatment of acute pancreatitis. J Pancreas, 2007, 8(4 Suppl): 518-525.
- [14] Kitagawa M, Hayakawa T. Antiproteases in the treatment of acute pancreatitis. J Pancreas, 2007, 8(4 Suppl): 518-525.