

虎纹捕鸟蛛毒素-1 突变体 K3A-HWTX-1 的化学合成与生理活性分析*

王贤纯 梁宋平

罗泽民

(湖南师范大学生物学系, 中国长沙, 410081) (湖南农业大学生物技术系, 中国长沙, 410128)

摘要 采用固相 Fmoc 法在自制自动蛋白质化学工作站上合成了其第3位赖氨酸(K3)被丙氨酸(A)取代的虎纹捕鸟蛛毒素-1的突变体 K3A-HWTX-1。合成的突变体用 Edman 降解和电喷雾质谱进行鉴定。K3A-HWTX-1 经谷胱甘肽系统进行氧化复性后通过离子交换和反相 HPLC 纯化。活性分析结果表明, K3 被 A 取代后 HWTX-1 的生物活性下降了 80%, 提示 K3 与 HWTX-1 的生物活性有一定的相关性。

关键词 蜘蛛, 虎纹捕鸟蛛毒素-1, 突变体, 固相多肽合成

分类号 Q516, Q966, R99

Chemical Synthesis and Physiological Activity Analysis of K3A-HWTX-1: A Mutant of Huwentoxin-1

Wang Xianchun Liang Songping

(Department of Biology, Hunan Normal University, Changsha, 410081, PRC)

Luo Zemin

(Department of Biological Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, 410128, PRC)

Abstract K3A-HWTX-1, a mutant of the neurotoxic peptide Huwentoxin-1 in which the residue Lys3 is replaced by Ala, was synthesized by solid phase chemical method on our automatic working station for protein chemistry. The synthetic peptide was identified by Edman degradation and ESI (Electrospray ionization) mass spectrum. K3A-HWTX-1 was renatured in oxidative buffer containing glutathione and purified by ion-exchange and reversed phase HPLC. Physiological experiment indicated that the substitution of Lys3 by Ala leads to 80% decrease in biological activities of HWTX-1, suggesting that residue Lys3 (or K3) is related to its activities to a certain extent.

Key words spider, Huwentoxin-1, mutant, solid phase peptide synthesis

* 本研究为国家“八六三”课题资助项目

收稿日期: 1998-04-26. 作者: 王贤纯, 男, 39岁, 副教授, 博士生; 梁宋平(通讯作者), 男, 52岁, 教授, 博士生导师; 罗泽民, 男, 70岁, 教授, 博士生导师

虎纹捕鸟蛛毒素- (Huwentoxin-, 简称 HWTX-) 是从虎纹捕鸟蛛(*Selenocosmia huwena*) 粗毒中分离出来的 1 种新型多肽类神经毒素. 梁宋平等已对其结构和性质进行了系统的研究, 测出该毒素 33 个氨基酸残基的排列顺序和 3 对二硫键的连接位置^[1,2]; 通过 2 维核磁共振技术测定了它在溶液中的空间构象并实现了全化学合成^[3,4]. 实验证明, 该毒素能可逆地阻断小鼠膈神经-膈肌接头传递, 其作用位点在突触后膜的 n-乙酰胆碱受体(n-AchR)^[5]. 一般认为, 多肽类乙酰胆碱受体抑制剂活性与其碱性氨基酸残基有关. 瞿幼星等研究 HWTX- 的空间构象后推测, 第 3 位赖氨酸(K3) 可能与 HWTX- 和 n-AchR 的结合有关, 可能是 HWTX- 表现生理活性的关键残基之一^[3]. 定点突变是鉴定关键残基的常用方法. 用这种方法鉴定出 HWTX- 的关键和非关键残基之后, 不仅可以加深对 HWTX- 结构与功能的了解, 而且可以为 HWTX- 的结构和功能改造提供有价值的信息, 促进其与受体结合机制的研究. 本文报道 K3A-HWTX- 的化学合成及 A 替代 K3 后对 HWTX- 生理活性的影响.

1 材料和方法

1.1 主要试剂

二巯苏糖醇(DTT)、三氟乙酸(TFA)、还原型及氧化型谷胱甘肽(GSH, GSSG)、哌啶、苯并三唑四甲基脲四氟硼酸盐(TBTU)、1-羟基苯并三唑(HOBt) 和 N-甲基吗林(NMM) 均为 Sigma 产品; 二巯基乙烷、苯甲硫醚为 Aldrich 产品; 9-苄氧羰基(Fmoc) 氨基酸衍生物为 Millipore 产品, 其中部分氨基酸侧链保护方法如下: Ser 和 Thr 为叔丁醚(tBu); Glu 和 Asp 为叔丁酯(OtBu); Cys、His 和 Asn 为三苯甲基(Trt); Arg 为 2,2,4,6,7-五甲二氢苯并咪喃-5-磺酰基(Pbf); Lys 为叔丁氧羰基(Boc); PEG-PS·HCl 树脂为美国波士顿大学 R. Laursen 教授赠送; 其余试剂为国产光谱纯或分析纯试剂, 其中二甲基甲酰胺(DMF) 为重蒸试剂.

1.2 K3A-HWTX- 的固相合成

1.2.1 树脂的活化和第 1 个氨基酸的偶联

PEG-PS·HCl 树脂的活化和第 1 个氨基酸酯化偶联的操作基本上按文献[6]的方法进行: 取 0.05 mmol(217 mg) 树脂, 在 HOBt 的催化下与 4-羟甲基苯氧乙酸五氟苯酯反应, 从而在树脂上接上 1 个带-OH 的活化基团(4-羟甲基苯氧乙酰基). 然后在二甲氨基吡啶(DMAP) 的催化下, K3A-HWTX- 的 C-端第 1 个氨基酸残基(亮氨酸, 呈 N^α-Fmoc-L-Leu-OPfp 的形式) 的羧基与活化基团上的-OH 以酯键连接. 按文献[7]的方法测偶联率. 用乙酸酐封闭残存的-OH 基, 从而完成突变体 K3A-HWTX- 固相合成的起始步骤.

1.2.2 第 2 至最后 1 个氨基酸的偶联

在本研究室自行设计制造的自动蛋白质化学工作站上使用多肽链按 K3A-HWTX- 的氨基酸顺序从 C-端向 N-端逐步延伸. 氨基酸衍生物为 N^α-Fmoc-AA-OH 形式, 用量为树脂当量的 5 倍; 催化剂为 TBTU、HOBt 及 NMM; 溶剂为 DMF; 脱保护用 20% 哌啶. 经过 32 步偶联反应及最后去 Fmoc 后得到残基带侧链保护的 33 肽树脂.

1.2.3 裂解

将充分洗涤的 33 肽树脂真空冷冻干燥, 然后参照文献[6]的方法将 K3A-HWTX-

从树脂上裂解切割下来. 裂解液体积比 TFA 苯甲硫醚 二巯基乙烷 苯甲醚为 90 : 5 : 3 : 2. 避光摇动反应 2.5 h; 滤取裂解液并用 TFA 多次洗涤树脂; 用预冷乙醚沉淀裂解液中的多肽并用乙醚多次洗涤之; 最后真空冷冻干燥得到残基脱保护的 K3A-HWTX- 合成粗品.

1.3 K3A-HWTX- 的还原氧化及分离纯化

样品的还原参照文献[8]的方法: 取 20 mg 粗品溶于 2.0 ml 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.5, 含 6 mol/L 盐酸胍, 0.001 mol/L EDTA 和 0.1 mol/L DTT). 室温(20)反应 2 h 后用冰醋酸酸化至 pH 4.0 以备脱盐纯化.

还原样品液的脱盐纯化在 Waters Millenium 2010 色谱管理系统上进行; 996 光电二极管阵列检测器检测; 色谱柱为自装制备型 YWG C18 10 μm 反相柱(7.5 \times 300 mm); 洗脱系统为: (A) 0.1% TFA 水溶液; (B) 含 0.1% TFA 的乙腈. 过滤的还原样品液进入色谱柱后用 A 液充分洗脱至流出液在 230 ~ 380 nm 下的光吸收值为零后用乙腈梯度将样品洗脱. 收集目的峰并真空冷冻干燥.

将还原样品溶于氧化液(0.1 mol/L 乙酸铵, 调 pH 9.5, 含 0.3 mmol/L GSSG 和 3.0 mmol/L GSH), 样品浓度约为 4.0×10^{-5} mol/L; 20 ~ 25 反应 24 h 以后用 RP-HPLC 脱盐纯化, 方法同还原样品液脱盐纯化.

样品的离子交换 HPLC 纯化在 waters 650E 色谱仪上进行. 色谱柱为 waters AP-1 CM 阳离子交换柱; 洗脱系统为: (A) 0.2 mol/L 磷酸二氢钠; (B) 0.2 mol/L 磷酸氢二钠; (C) 1.0 mol/L 氯化钠; (D) 双蒸水. 样品上柱后用 NaCl 梯度将样品洗脱, 然后再用 RP-HPLC 脱盐纯化.

1.4 产物的鉴定

合成产物的准确质量的鉴定在英国 Micromass 公司生产的 LCT 电喷雾质谱仪上进行. N-端序列测定参照文献[9]的方法在 MilliGen 6600 型固相蛋白质顺序分析仪上进行.

1.5 生理活性的检测

参照文献[5]的方法, 用昆明种小白鼠(体重 18 ~ 22 g) 的膈神经-膈肌标本测定 K3A-HWTX- 的生理活性. 将新剥制的标本放入盛有台氏生理液的标本槽, 通过小塑料管不断向槽内台氏液输入 95% 氧气和 5% 二氧化碳的混合气体, 并通过循环恒温水浴使标本槽内温度维持在 30 ~ 32 . 通过电极对膈神经施加频率为 0.2 Hz 的刺激, 由此引起的膈肌收缩反应通过传感器转化为电信号, 并通过放大器由二道生理仪描记下来. 待间接刺激引发的膈肌收缩反应稳定后, 将标本槽内的台氏液分别换成 5.3×10^{-6} mol/L 的 K3A-HWTX- 或天然 HWTX- . 记录它们的阻断时间.

2 结果与讨论

2.1 K3A-HWTX- 的固相合成

PEG-PS · HCl 树脂本身带有许多氨基, 在一定条件下可以与氨基酸的羧基相连, 但为了获得 C-端为羧基的目的多肽, 必须事先活化, 连上 1 个带-OH 的“接头”. 这一反应过程由于 4-羟甲基苯氧乙酸五氟苯酯具有很高的反应活性, 加上 HOBt 的催化, 所以比较容易完成. 一次活化处理, 反应 2.5 h 一般可使活化率达 97% 以上. 相对而言, 第 1 个氨基酸与

“接头”间的偶联要困难一些,这是因为它们是以酯键而不是肽键连接.第1个氨基酸的偶联方法常用的有两种:五氟苯酯法和对称酞法.实验中发现,五氟苯酯法的偶联效率一般高于对称酞法,偶联1次的偶联率即可达到74%(Fmoc法)或95%(茚三酮法)以上.一般情况下不需进行第2次偶联.其后再经过32步偶联反应及最后的脱Fmoc步骤共得到424.7mg带侧链保护基团的33肽树脂.因为采用的氨基酸侧链保护基团均有酸不稳定性,所以用酸性裂解液从树脂上裂解切割多肽的同时就脱除了各侧链保护基团.裂解液中的苯甲醚、二巯基乙烷和苯甲醚起着清除这些脱落的保护基团的作用,防止其对某些氨基酸残基产生化学修饰作用.裂解时产生的大多数副产物可在沉淀目的多肽时经乙醚的多次洗涤而去除.

通过裂解及乙醚的处理后共得K3A-HWTX-粗品98.8mg.其RP-HPLC层析图谱见图1.

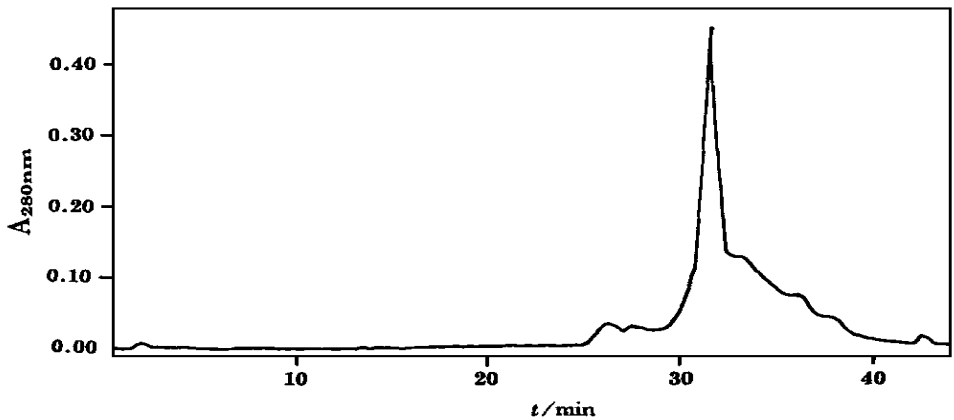


图1 K3A-HWTX-1合成粗品RP-HPLC层析图谱
 色谱柱:自装YWG C18 10 μ m反相柱,3.9 \times 300 mm
 洗脱系统:A液:0.1% TFA水 B液:含0.1% TFA 乙腈
 洗脱梯度:0~35 min B液0%~93%,流速0.7 ml/min
 柱室温度:40 ;280 nm检测.

Fig. 1 Analytical chromatogram of crude lyophilized K3A-HWTX- by RP-HPLC
 Column: YWG C18 10 μ m reversed phase column, 3.9 \times 300 mm
 Buffer: A: 0.1% TFA in water, B: 0.1% TFA in acetonitrile
 Gradient: 0% ~ 93% B in 35 min, Flow rate: 0.7 ml/min
 Temperature: 40 , Detection: 280 nm

从图1可以看出,合成粗品的主峰明显,杂质(或缺损肽)比例小;说明合成效果是令人满意的.

2.2 K3A-HWTX- 的还原氧化与分离纯化

刚从树脂上裂解下来的K3A-HWTX-呈变性状态,而不具生理活性,所以在检测其活性之前,必须提供适宜的条件使其形成特定的空间构象和正确的二硫键配对方式.氧化复性前的还原处理是为了使合成产物的巯基呈均一的还原状态,而还原后的仔细脱盐纯化可防止某些盐类或其它杂质在以后的氧化复性体系中干扰目的肽的氧化折叠.

在20~25 温度条件下,含GSH-GSSG对的氧化复性体系能使多肽迅速进行氧化折叠.由于氧化液中目的肽的浓度很低,大大减少了分子间的作用,二硫键的连接主要在分子

内进行. GSSG 与还原目的肽形成混合二硫键并因此而激发分子内的二硫键形成; GSH 使已形成的二硫键变成混合二硫键^[10]; 过量 GSH 的使用可使错误折叠的分子还原并使溶剂能够进入到形成二硫键的部位, 这样在折叠中的中间产物和受热力学控制的终产物之间就存在一种平衡. 由于二硫键正确配对的分子在热力学上最稳定, 所以平衡有利于形成二硫键配对及空间构象正确的分子. 氧化复性后的样品经离子交换 HPLC 的纯化效果见图 2.

收集图 2 中的主峰部分经 RP-HPLC 脱盐纯化后呈单一的对称主峰, 见图 3. 说明纯化效果是令人满意的.

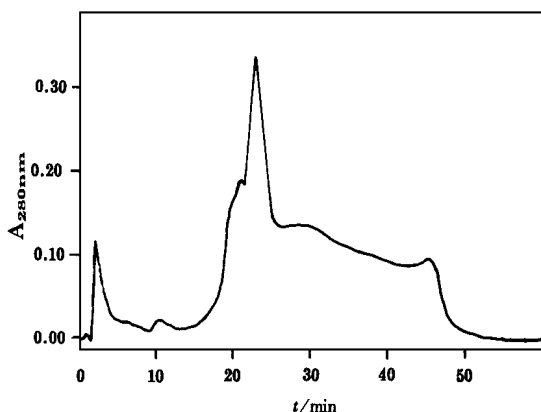


图 2 K3A-HWTX-1 离子交换 HPLC 层析图

Fig. 2 Ion-exchange HPLC of K3A-HWTX-1

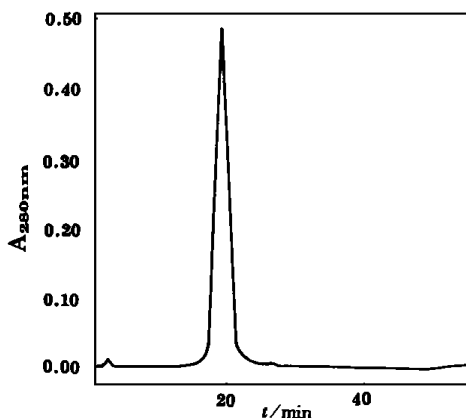


图 3 完全复性 K3A-HWTX-1 的

RP-HPLC 层析图

Fig. 3 RP-HPLC of completely renatured

K3A-HWTX-1

2.3 K3A-HWTX- 的鉴定

K3A-HWTX- 电喷雾质谱测定结果见图 4.

图中结果显示, 复性 K3A-HWTX- 的分子量为 3 691. 6, 理论分子量(均按氨基酸残基的 Monoisotopic Mass 计算)为 3 690. 7, 二者十分接近. 这不仅从一个侧面证明 K3A-HWTX- 合成的正确性, 而且证明氧化复性后 K3A-HWTX- 的 6 个-SH 都参与了二硫键的形成. N-端序列测定结果(循环图未列出)显示, 第 3 位氨基酸残基是 Ala; Ala 对第 3 位 Lys 的取代及 N-端序列是正确的.

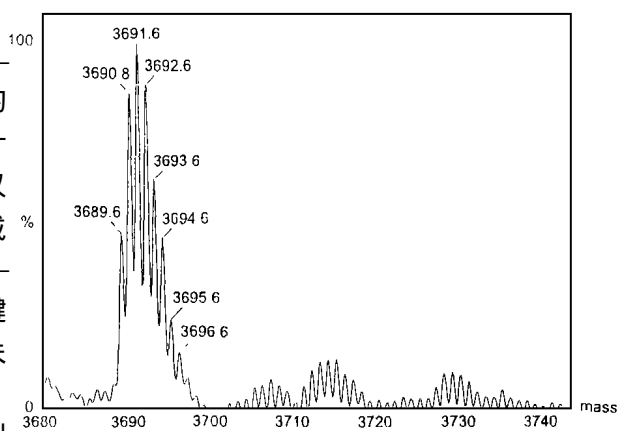


图 4 K3A-HWTX-1 电喷雾质谱图

Fig. 4 Nano-electrospray analysis of K3A-HWTX-1

2.4 生理活性检测

复性 K3A-HWTX- 及天然 HWTX- 的活性测定结果见图 5.

图 5 显示, 在台氏液中, 间接刺激神经引起的膈肌收缩能长时间保持相对的稳定; K3A-

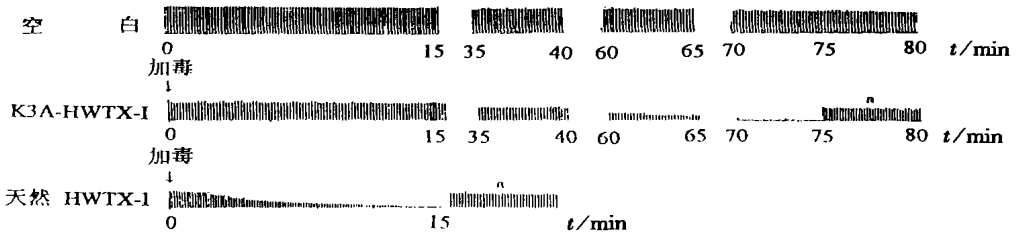


图5 K3A-HWTX-I 和天然 HWTX-I 对小鼠膈神经-膈肌接头的阻断作用比较
(a 为阻断后直接刺激引起的肌肉收缩)

Fig. 5 Blockades of neuromuscular transmission by K3A-HWTX-I and natural HWTX-I
(a: Responses of muscle elicited by direct stimulation after blockade)

HWTX- 能在 75 min 内完全阻断膈神经-膈肌接头的传递,而相同浓度下的天然 HWTX- 的阻断时间为 15 min,可见 K3 突变成 A 后 HWTX- 的活性下降了 80%. 此外,二者对‘接头’的阻断都不影响对膈肌的直接刺激.

综上所述,应用本研究室自行设计制造的全自动蛋白质化学工作站,能顺利有效地合成多肽分子. 虽然合成的 K3A-HWTX- 粗品呈变性状态,但可通过提供适当的复性条件使之形成正确的空间构象和二硫键配对方式,从而显示应有的生理活性. 与天然 HWTX- 相比,K3A-HWTX- 的活性降低了 80%,这说明 HWTX- 第 3 位赖氨酸残基是 HWTX- 发挥生理活性的重要残基之一,但不是活性中心关键残基,因为将活性中心关键残基取代后,活性损失将达到 100%. A 替代 K3 后可能减弱了 HWTX- 与 n-AchR 的结合能力或影响了整个分子正常的空间构象. 有关内容正在进一步研究之中.

致谢 英国 Micromass 公司舒放先生协助进行突变体的质谱测定工作,特此致谢!

参 考 文 献

- 1 Liang S P, Zhang D Y, Pan X et al. Properties and amino acid sequence of Huwentoxin- , a neurotoxin purified from the venom of the bird spider Selenocosmia huwena. *Toxicon*, 1993, 31(8): 969 ~ 979
- 2 Zhang D Y, Liang S P. Assignment of the three disulfide bridges of Huwentoxin- , a neurotoxin from the spider Selenocosmia huwena. *J Protein Chem*, 1993, 12(6) : 735 ~ 740
- 3 Qu Y X, Liang S P, Ding J Z et al. Proton nuclear magnetic resonance studies on Huwentoxin- from the venom of the spider Selenocosmia huwena: 1. Sequence-specific H-NMR assignments. *J Protein Chem*, 1995, 14(7) : 549 ~ 557
- 4 梁宋平,夏赞贤,谢锦云. 虎纹捕鸟蛛毒素- 的化学合成及其结构与生理活性分析. *中国科学(C 辑)*, 1997, 27(5): 391 ~ 397
- 5 Zhou P A, Xie X J, Li M et al. Blockade of neuromuscular transmission by Huwentoxin- , purified from the venom of the chinese bird spider Selenocosmia huwena. *Toxicon*, 1997, 35: 39 ~ 45
- 6 Atherton E, Sheppard R C. *Solid Phase Peptide Synthesis: a Pratical Approach*. Oxford Oxford University Press, 1989. 47 ~ 122

参 考 文 献

- 1 Rambaldi A et al. Expression of leucocyte alkaline phosphatase gene in normal and leukemic cells. *Blood*, 1990, 76(12): 2565 ~ 2571
- 2 Fishman W H et al. Alkaline phosphatase isozymes recent progress. *Clin Biochem*, 1990, 23: 99 ~ 104
- 3 Harris H et al. The human alkaline phosphatase: what we know and what we don't know. *Clin Chim Acta*, 1989, 186: 133 ~ 150
- 4 Koshida K et al. A potential use of a monoclonal antibody to PLAP to detect lymph node metastases of seminoma. *J Urology*, 1996, 155(1): 337 ~ 341
- 5 Iles R K et al. Production of PLAP and PLAP-like material by epithelial germ cell and non-germ cell tumours in vitro. *Br J Cancer*, 1994, 69(2): 274 ~ 278
- 6 Nair B C et al. Rat alkaline phosphatase. *Arch Biochem Biophys*, 1987, 254(1): 18 ~ 27
- 7 Slaughter C A et al. Discrimination of human PLAP allelic variants by monoclonal antibodies. *Am J Hum Genet*, 1983, 35: 1 ~ 20
- 8 Smith P K et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 1985, 150: 76 ~ 85
- 9 Morton R K et al. Purification of alkaline phosphatase. *Biochem J*, 1954, 57(1): 595 ~ 603
- 10 Stevens V L. Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol membrane anchors. *Biochem J*, 1995, 310: 361 ~ 370
- 11 Chang T S et al. Human placental alkaline phosphatase. *Eur J Biochem*, 1992, 209: 241 ~ 247
- 12 Stevens V L et al. Isolation and characterization of a CHO mutant defective in the second step of GPI biosynthesis. *Biochem J*, 1996, 313: 253 ~ 258

(上接第 92 页)

- 7 Sarin V K, Kents B H, Tam J P et al. Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction. *Analytical Biochemistry*, 1981, 34: 595 ~ 598
- 8 Saena V P, Wetlaufer D B. Formation of three-dimensional structure in proteins, a rapid nonenzymic reactivation of reduced Lysozyme. *Biochemistry*, 1970, 9: 5015 ~ 5021
- 9 Nishio H, Kumagaye K Y, Chen Y N et al. Synthesis and disulfide structure determination of ω -agatoxin A. Peptides. Chemistry, Structure and Biology. Proceedings of the Thirtieth American Peptide Symposium. Leiden: ESCOM press, 1993. 30 ~ 33
- 10 Creighton T E. Disulfide bond formation in proteins. *Methods Enzymol*, 1984, 107: 305 ~ 329