

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

王贤纯 梁宋平*

(湖南师范大学生命科学学院 长沙 410081)

罗泽民

(湖南农业大学生物技术系 长沙 410128)

摘 要 虎纹捕鸟蛛毒素-I (Huwentoxin-I, HWTX-I) 是从虎纹捕鸟蛛 (*Selenocosmia huwena*) 的粗毒中分离出的一种多肽类神经毒素。为了探明该毒素分子中唯一的 Arg 残基与其生物学活性的关系, 运用固相多肽合成技术和 Fmoc 化学直接构建了 Ala 取代 HWTX-I 第 20 位 Arg (R20) 的突变体 R20A-HWTX-I。将合成的突变体置于含谷胱甘肽的缓冲体系中氧化复性后用反相和特殊设计的离子交换 HPLC 纯化, 并对之进行氨基酸组成、Edman 降解与质谱分析。活性测定结果表明, HWTX-I 分子中的 R20 被 A 取代后, 活性下降了 92%, 提示 R20 是与活性密切相关的重要残基。

关键词 虎纹捕鸟蛛毒素-I, 突变体, 固相多肽合成, 蛋白质工程, 蜘蛛

中图分类号 Q816 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)04-0490-05

由于天然多肽类毒素在神经生物学和医药学等众多领域内有着广阔的应用前景, 所以近年来这类天然毒素的研究受到越来越多的关注。许多毒素的结构和功能被相继阐明, 其中部分毒素已经成为生物学和药理学研究中的工具试剂, 如 α -银环蛇毒素 (α -bungarotoxin) 用于 nAChR 的研究, ω -芋螺毒素 (α -conotoxins) 用于钙离子通道的研究等^[1]。与此同时, 以多肽毒素为对象的蛋白质工程研究也正处于较快的发展之中。

虎纹捕鸟蛛毒素-I (HWTX-I) 能阻断小鼠膈神经-膈肌标本的神经肌肉接头传递, 作用位点在突触前膜^[2]。该毒素只含 33 个氨基酸残基, 其中的 6 个 Cys 残基均参与三对二硫键的形成^[3]。其分子采取一种紧凑、致密的空间构象, 包含典型的“抑制剂胱氨酸结模体” (Inhibitor cystine knot motif)^[4]。这类毒素分子量小, 合成容易, 稳定性高, 不易失活, 是开展蛋白质工程研究的理想模型^[5]。

包括 HWTX-I 在内的许多多肽毒素都是碱性多肽, 含有较多的 Lys 和 Arg。有关研究业已证明, 这些碱性氨基酸残基大多位于分子表面, 常常参与

活性位点的组成。HWTX-I 分子中含有 6 个 Lys, 1 个 Arg。构象分析结果表明, 它们的侧链都不同程度地位于毒素分子的表面, 可能与毒素的生物学活性有关。在 7 个碱性氨基酸残基中, 仅有一个是 Arg (位于第 20 位, 即 R20), 而且其侧链的溶剂可及程度最低 (14%)^[4], 所以, R20 与 HWTX-I 生物学活性的关系就成了一个有趣的问题。本文旨在用固相多肽合成技术, 直接构建 HWTX-I 分子中第 20 位 Arg 被 Ala 取代的突变体 R20A-HWTX-I, 鉴定 R20 与 HWTX-I 生物学活性的关系; 同时, 对化学合成产物的氧化折叠及分离纯化方法等进行适当的探讨; 不仅加深对于 HWTX-I 结构与功能关系的了解, 而且可为蛋白质工程产物的后加工处理提供参考资料。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

苯丙三唑四甲基脲四氟硼酸盐 (TBTU), 1-羟基苯丙三唑 (HOBt), N-甲基吗啉 (NMM), 二甲基甲酰胺 (DMF), 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;PHB树脂为Applied Biosystems公司产品;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:Ser和Thr为叔丁醚(tBu)保护;Glu和Asp为叔丁酯(OtBu);Cys、His和Asn为三甲基(Trt);Lys为叔丁氧羰基(Boc)。所用的其它试剂均为市场上纯度最高的试剂。

自动多肽合成仪为Pioneer™ Peptide Synthesis System,PerSeptive Biosystems公司产品。

1.2 突变体的固相合成

突变体R20A-HWTX-I的固相合成在Pioneer™多肽合成仪上进行。PHB树脂的用量为0.1mmol。在TBTU、HOBt及NMM的介导下,用5倍过量的Fmoc氨基酸进行偶联。用20%哌啶去Fmoc保护,溶剂为DMF。最后侧链保护基团的去除和多肽链的裂解用试剂R(TFA:苯甲硫醚:二巯基乙烷:苯甲醚=90:5:3:2,V/V)同时进行^[6],室温下反应2.5h。裂解下来的多肽用预冷乙醚沉淀,离心收集;乙醚洗涤多次后冷冻干燥。

1.3 氧化复性和分离纯化

在20A-HWTX-I的氧化复性之前,先参照文献7的方法对其进行还原及脱盐和纯化处理。还原型R20A-HWTX-I的氧化折叠参照文献8的方法进行:将冻干的还原型R20A-HWTX-I样品溶于适当体积的乙酸胺缓冲液(0.1mol/L,0.002mol/L EDTA,0.003mol/L GSH和0.0003mol/L GSSG,pH 9.5)中,使样品浓度在 10^{-5} mol/L左右。室温(20~25℃)下反应24h后,用冰醋酸将反应混合液酸化至pH3.0~4.0并再次用反相柱脱盐。经脱盐的氧化型R20A-HWTX-I样品的进一步纯化在带Waters P-1阳离子交换柱(10mm×100mm)的Waters 650E色谱系统上进行,洗脱液(A)0.2mol/L NaH₂PO₄(B)0.2mol/L Na₂HPO₄(C)1.0mol/L NaCl(D)双蒸水。先后进行两次离子交换(配合以反相HPLC脱盐)。第一次用NaCl的线性梯度[40min内0~80%(C)]洗脱;第二次用pH(Na₂HPO₄)梯度洗脱。洗脱速度为1.0mL/min。

分离纯化过程中,用监测活性的方式跟踪目的峰。

1.4 产物的鉴定

R20A-HWTX-I氨基酸组成分析按文献9的方法进行;序列分析按文献10的方法进行;准确质

量的测定在美国Bruker公司生产的ProFLEX™ III型MALDI-TOF(Matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight)质谱仪上进行:线性模式检测正离子;激光重复率5.00Hz;离子源加速电压1(IS/1)20.00kV;离子源加速电压2(IS/2)18.5kV;凸镜电压(Lens voltage)7.5kV;仪器的控制和数据的处理由Bruker公司开发的控制软件和Sun工作站完成。用0.1%TFA-30%乙腈/水混合液制备CCA(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid)的饱和液,然后取1 μ L样品(1pmol)与19 μ L此CCA饱和液混合,再取1 μ L混合液在质谱仪的样品盘上点样,室温干燥后测定。用外标法进行校正。

1.5 生物学活性的测定

参照文献11的方法,用离体小白鼠膈神经-膈肌标本测定R20A-HWTX-I的神经毒活性。

2 结果

2.1 突变体的合成效果

冷冻干燥后的R20A-HWTX-I粗品经RP-HWTX-I分析的结果见图1。

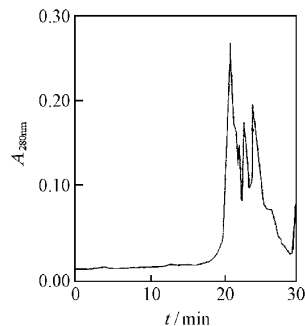


图1 R20A-HWTX-I合成粗品的RP-HPLC分析图谱

Fig.1 Analytical chromatogram of crude synthetic R20A-HWTX-I by RP-HPLC

Column:YWG C18 10 μ m reverse-phase column 4.0mm×250mm
Buffer (A)0.1% TFA in water (B)0.1% TFA in acetonitrile
Gradient:10%~75%(B) in 23min, Flow rate 0.7mL/min,
Temperature 40℃,Detection 280nm

质谱分析结果证明,图1中保留时间约为21min的主峰为目的肽峰。该峰面积占总面积的36.77%,提示合成粗品中目的肽的含量大约在1/3左右。

2.2 复性突变体的分离纯化

R20A-HWTX-I氧化复性后,在RP-HPLC分析中形成了主峰明显的图谱(图2)。活性监测结果表明,图中的主峰为复性峰,提示大多数R20A-HWTX-I分子已复性,同时也有部分空间构象略

有差异的不完全复性的分子存在。由于它们与复性分子的疏水性差异很小,反相柱难以将它们完全分开,故收集在一起后用离子交换 HPLC 进一步纯化。第一次离子交换纯化(盐梯度洗脱)结果见图 3。

图 3 中箭头所指的尖峰(保留时间约为 35min)为复性峰。其第二次离子交换 HPLC(pH 梯度洗脱)纯化结果见图 4。

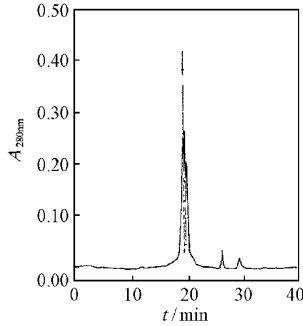


图 2 R20A-HWTX-I 氧化复性样品 RP-HPLC 分析图谱

Fig. 2 Analytical chromatogram of oxidatively renatured R20A-HWTX-I by RP-HPLC.

↓ Renatured peak

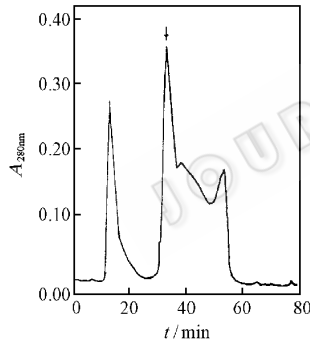


图 3 复性 R20A-HWTX-I 样品第一次离子交换 HPLC 图谱(盐梯度洗脱)

Fig. 3 The first ion-exchange HPLC chromatogram of oxidatively renatured R20A-HWTX-I (eluted by a NaCl gradient)

活性检测及质谱分析结果表明,图 4 中箭头所指的尖峰(保留时间约为 32min)为复性峰。它在分析型 RP-HPLC(图 5)及质谱图(图 6)中均呈现单一的谱峰,说明样品已纯化至均一程度。

图 6 显示, R20A-HWTX-I 的分子量($M+H$)⁺ 为 3666.97D,而其理论值为 3665.45D,二者十分接近,提示 R20A-HWTX-I 分子中 6 个半胱氨酸残基的巯基均参与了二硫键的形成。此外,通过序列分析连续测定了 R20A-HWTX-I N 端的 20 多个残基,结果表明, R20A-HWTX-I 分子 N 端的序列为

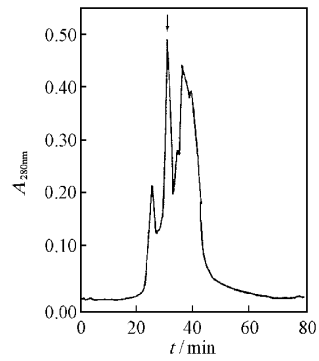


图 4 复性 R20A-HWTX-I 第二次离子交换 HPLC 纯化图谱(pH 梯度洗脱)

Fig. 4 The second ion-exchange HPLC chromatogram of oxidatively renatured R20A-HWTX-I (eluted by a pH gradient)

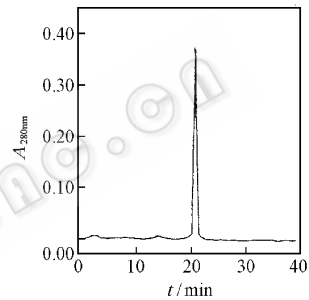


图 5 复性突变体 R20A-HWTX-I 纯品的分析型 RP-HPLC 图谱

Fig. 5 The analytical RP-HPLC profile of the renatured and purified R20A-HWTX-I

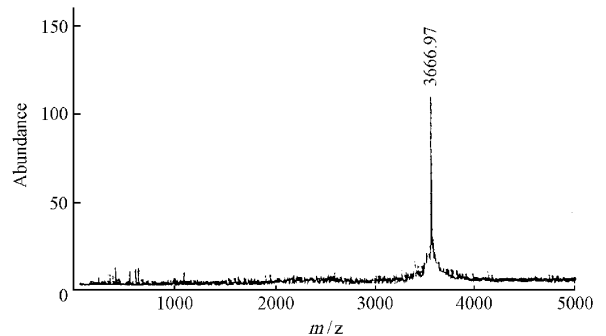


图 6 突变体 R20A-HWTX-I 纯品质谱分析图

Fig. 6 MALDI-TOF mass analysis of the purified R20A-HWTX-I

H₂N-ACKGVFDCTPGKNECCPNAVCS—, 而 HWTX-I N 端的相应序列为 H₂N-ACKGVFDCTPGKNECCPNRVCS—, 所以, R20A-HWTX-I N 端的序列与预期的完全相符,第 20 位是 A 而不 R。R20A-HWTX-I 的氨基酸组成分析

结果也与理论值相符(括号中为理论值):Ala 3.15(3),Asx 3.40(4),Glx 1.14(1),Gly 1.95(2),His 0.92(1),Leu 1.17(1),Lys 5.82(6),Phe 0.93(1),Pro 2.10(2),Ser 0.91(1),Thr 0.97(1),Val 2.10(2)。Cys 和 Trp 因酸水解破坏不能定量测定。说明 R20A-HWTX-I 的合成是正确的。

2.3 突变体的生物学活性测定

活性测定结果如表 1。可见,Ala 替代 HWTX-I 第 20 位 Arg 后,HWTX-I 的神经毒活性下降了 92%。

表 1 R20A-HWTX-I 和天然 HWTX-I 对小鼠膈神经-膈肌接头传递的影响

Table 1 Effects of R20A-HWTX-I and natural HWTX-I on the neuromuscular transmission of isolated mouse phrenic nerve-diaphragm preparation

Peptide	Concentration ($\mu\text{mol/L}$)	Blockade time/min	Relative activity/%
Natural HWTX-I	2.7×10^{-6}	27	100
R20A-HWTX-I	5.5×10^{-6}	129	8

3 讨论

多肽毒素结构与功能的蛋白质工程改造可以通过基因工程的途径实现,也可以通过多肽合成直接突变氨基酸残基的途径进行。用固相多肽合成的方式构建这类分子的突变体具有简洁、快速的特点,不仅可以在较短的时间里对多肽分子的关键残基、活性部位以及结构与功能的关系等作出鉴定,而且有可能得到生物学活性增高的突变体或通过活性位点的转移使活性多肽分子获得新的功能乃至创造出自然界本不存在的全新蛋白质。

用固相化学合成方法制备的突变体刚从树脂上切下时处于变性状态,在活性鉴定之前必须进行复性处理。尽管有利用粗品直接进行氧化复性的报道^[12,13],但在本研究中发现,进行氧化复性之前对合成粗品进行适当的还原处理,并对合成粗品及还原样品液进行仔细的脱盐纯化可使氧化复性后的“复性峰”面积增大,杂峰减少。这可能是由于空气及某些氧化性物质的影响,使合成粗品中多肽的-SH 呈现影响二硫键正确配对的各种氧化形式,所以氧化复性前使合成多肽的巯基处于均一的还原状态,同时除去粗品中残存的清除剂、残缺肽及还原液中的还原剂等杂质有利于氧化复性的顺利进行。

虽然在低温及空气氧化的条件下,多肽的氧化

复性相当缓慢^[14]。但在室温及有 GSSG-GSH 等复性“促进剂”存在时复性十分迅速。不过,由于谷胱甘肽介导的二硫键配对是一个平衡过程,难以进行到底^[15],加上突变体分子较小或有部分消旋的影响,所以复性液中总会或多或少存在一些二硫键错配的构象异构体。它们分子表面的疏水性及电荷分布差异较小,所以大多数情况下难以用单一的分选方法将它们分开。用同一根离子交换柱先后进行两次离子交换,间以反相柱脱盐,一次用盐梯度洗脱,另一次则用 pH 梯度洗脱,不失为一种巧妙的分离纯化构象异构体的方法。

进行单残基替换突变时,一般是用 Ala 或 Gly 替换可能的关键残基。若替换后蛋白质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的关键残基;反之则是与活性关系不大或无关的残基。一般认为,Ala 比 Gly 更适合替换大多数残基,因为 Ala 不带电荷,侧链小,没有形成氢键的能力,一般不参与活性位点的组成;在蛋白质构象中的位置既不像 Gly 那样灵活。又不像 Pro 那样呆板,是一种适中的选择;此外,Ala 本身在蛋白质中的含量比 Gly 高,在蛋白质的各种二级结构中都有 Ala 的存在^[16],而且有人证明 Ala 比 Gly 更能稳定蛋白质的 α -螺旋结构^[17],因此,许多有关研究都是用 Ala 替换,进行所谓的“丙氨酸扫描”(Ala-Scanning)。

蛋白质的氧化折叠不是一个简单的过程,涉及许多复杂的反应。在该过程中,有可能形成二硫键配对方式不同的多种类型的分子构象,但在二硫键配对正确和错配分子构象之间存在动态平衡,当然,这种动态平衡倾向于形成二硫键配对正确的分子构象,因为二硫键配对正确的分子构象更具有热力学上的稳定性^[18],最终使得具有正确二硫键配对和适宜空间构象的多肽分子占大多数,从而在反相 HPLC 图谱中呈现一个“复性主峰”。

尽管本文工作中没有直接测定 R20A-HWTX-I 的二硫键配对情况,但参考文献^[19]中的 NMR 等方法鉴定化学合成的 HWTX-I 的复性真实性时证明了这种复性条件下二硫键正确配对的可靠性。此外,R20A-HWTX-I 氧化折叠处理以前以及“复性主峰”以外的峰均完全不能阻断膈神经-膈肌标本的神经肌肉接头的传递,所以,生物学活性的测定结果也间接地证明了 R20A-HWTX-I 氧化折叠的正确性。

利用小白鼠膈神经-膈肌标本所进行的活性测

定结果表明,与天然 HWTX- I 相比,R20A-HWTX- I 的生物学活性降低了 92%,说明 HWTX- I 的第 20 位精氨酸虽然其侧链的溶剂可及程度最低(14%),但仍是与 HWTX- I 生物学活性相关程度较大的重要残基。联想到有的碱性氨基酸残基(如第三位的 Lys)的侧链溶剂可及程度比 R20 的高

(66%),但与 HWTX- I 的生物学活性的关系反而不如 R20 的密切(K3A-HWTX- I 保留 20%的生物学活性)^[8],提示即使是多肽分子中同一类型的氨基酸残基,其侧链的溶剂可及程度也并不能反映残基与活性关系的密切程度。

参 考 文 献

- [1] 梁宋平,潘欣.生物化学与生物物理进展,1994,21(5):390~395
- [2] 陈湘定,彭宽,梁宋平.生命科学研究,1998,2(4):273~277
- [3] ZHANG D Y,LIANG S P. *J Protein Chem*,1993,12:735~740
- [4] QU Y X,LIANG S P,LIU X *et al.* *J Protein Chem*,1997,16:565~574
- [5] 梁宋平.生命的化学,1997,17(5):21~23
- [6] Atherton E,Sheppard R C. *Solid Phase Peptide Synthesis a Practical Approach*. Oxford Oxford University Press, 1989, pp. 47~122
- [7] Saxena V P,Wetlauffer D B. *Biochemistry*,1970,9:5015~5021
- [8] 王贤纯,梁宋平,罗泽民.生命科学研究,1998,2(2):87~92
- [9] LIANG S P,ZHANG D Y,PAN X *et al.* *Toxicon*,1993,31(8):969~979
- [10] Nishio H,Kumagaya K Y,CHEN Y N *et al.* *Proceedings of the Thirteenth American Peptide Symposium*,Leiden:ESCOM Press,1993,pp. 30~33
- [11] ZHOU P A,XIE X J,LI M *et al.* *Toxicon*,1997,35:39~45.
- [12] Eugenia Drakopoulou,Joel Cotton, Henri Virelizier *et al.* *Biochemical and Biophysical Research Communications*,1995,213(3):901~907
- [13] Brigitte Pierret, Henri Virelizier, Claudio Vita. *Int J Peptide Res*,1995,46:471~479
- [14] Laszlo Nadasdi, Donald Yamashiro, David Chung *et al.* *Biochemistry*,1995,34:8076~8081
- [15] 王良友,潘和平,陈正英.有机化学,1998,18:576~580
- [16] Cunningham B C,Wells J A. *Science*,1989,244:1081~1085
- [17] Serrano L,Neira J L, Sancho J *et al.* *Nature*,1992,356:453~455
- [18] Pierret B,Virelizier H,Vita C. *Int J Peptide Protein Res*,1995,46:471~479
- [19] 梁宋平,夏赞贤,谢锦云.中国科学(C辑),1997,27(5):391~397

Chemical Synthesis and Characterization of R20A-HWIX- I , a Mutant of Huwentoxin- I with Single Residue Replacement

WANG Xian-Chun LIANG Song-Ping

(College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081)

LUO Ze-Min

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

Abstract Huwentoxin- I (HWTX- I) is a polypeptide neurotoxin purified from the venom of the spider *Selenocosmia huwena*. R20A-HWTX- I, a mutant of HWTX- I in which the Arg was replaced by Ala, was synthesized on solid support by using Fmoc chemistry. The synthetic mutant was oxidatively renatured in glutathione-containing buffer and then isolated by reversed phase and specially designed ion-exchange HPLC. The chemical structure of R20A-HWTX- I was confirmed by amino acid analysis, Edman degradation and MALDI-TOF mass analysis. Physiological experiment showed that the replacement of R20 by a decreased the bioactivity of the HWTX- I by 92%, indicating that R20 is a key residue closely related to the bioactivity of the HWTX- I.

Key words Huwentoxin- I, mutant, solid phase peptide synthesis, protein engineering, spider