

白喉毒素 E154 位突变及生物活性评价*

高 川** 王惠芳 张 靖 宋云扬 胡亚兰

(北京药物化学研究所, 北京 102205)

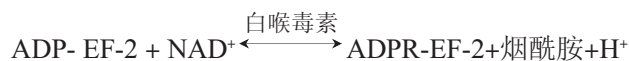
摘要 在量子化学计算的基础上, 结合目前关于白喉毒素结构与功能的研究状况, 选择把白喉毒素催化区的第 154 位谷氨酸分别突变为天冬氨酸和精氨酸, 研究此处电荷性质的改变对生物活性的影响. 通过基因定点突变方法制备这两个突变体基因, 并在大肠杆菌表达系统中获得高效表达, 在此基础上对它们的生物活性进行了评价. 结果表明, 与重组野生型白喉毒素相比, 突变体 E154D 的整体动物毒性和细胞毒性略有增加, 而 E154R 的毒性下降.

关键词 白喉毒素, 量子化学, 突变体, LD_{50} , IC_{50}

学科分类号 Q816

白喉毒素 (diphtheria toxin, DT) 是由感染了 β 噬菌体的白喉棒状杆菌产生的外毒素, 由寄生的 β 溶源性噬菌体的基因组编码^[1], 1~2 个分子即可灭活 1 个真核细胞, 对许多动物如家兔、豚鼠及灵长类的致死率很高^[2,3], 换算到人的致死剂量约为 $0.1 \mu\text{g} / \text{kg}$ ^[4].

白喉毒素基因由 1 827 bp 组成, 编码 560 个氨基酸, 分子质量约 58 ku. DT 由三个区域组成: N 端为催化区 (1~193), 中间为穿膜区 (202~378), C 端是受体结合区 (386~535). 完整的毒素分子经胰蛋白酶水解后, 在毒素分子上出现“缺口”, 成为由二硫键连接的 A 链 (21.2 ku) 和 B 链 (37.2 ku) 时方具有细胞毒性^[5,6]. A 链具有酶活性, 能催化氧化型 NAD^+ 对延伸因子 EF-2 的单一氨基酸残基——白喉酰胺, 发生二磷酸腺苷核糖酰基化 (adenosinediphosphoribosylate, ADPR), 使 EF-2 失活, 肽链延伸停止, 因而阻断蛋白质的合成.



晶体 X 射线衍射表明, DT 催化区有一裂隙^[7], 是 NAD 结合位点及催化反应中心. DTA 与 NAD 结合时^[8], 诱导活性位点的 39~46 位残基形成的活性环结构发生变化, 用以识别其作用底物 EF-2, 并与之结合.

对 DT 单个氨基酸的定点突变, 如 His21^[9]、Trp50^[10]、Tyr54^[11]、Try65^[12]、Glu148^[13,14] 和

Trp153^[15] 的研究结果表明, 与 NAD 结合相关的氨基酸残基有 His21、Trp50、Tyr54、Tyr65、Trp153, 与催化 NAD 水解相关的有 Tyr54、Trp153, 与 ADPRT 起作用的氨基酸残基有 Tyr54、Glu148、Trp153 等, 而且这些氨基酸残基在 ETA (绿脓杆菌外毒素) 中也高度保守.

本研究利用量子化学的前线轨道理论对 DT 进行分子轨道计算, 从电荷和能量的角度来确定催化区活性中心的关键氨基酸残基, 并对 DT 催化区 154 位谷氨酸进行了突变, 在大肠杆菌表达系统中获得了高效表达, 对突变体的生物活性进行了评价.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、细胞和质粒.

大肠杆菌 TOP10 购自天为时代公司; 大肠杆菌 BL₂₁(DE₃), 质粒 pET22b(+) 为本室保存. 白喉杆菌中毒型 38009 购自北京生物制品检定所菌种室.

细胞株 CHO-K1 和 HeLa 为本室液氮中保存, SMMC-7721、PLA-801D 和 BS-C-1 购自北京协和医科大学细胞中心.

*国家自然科学基金资助项目(30472212).

** 通讯联系人. Tel: 010-66758323-801, E-mail: g.ch.chuan@263.net

收稿日期: 2006-01-19, 接受日期: 2006-03-14

1.1.2 培养基. DEME 培养基、RPMI-1640 培养基为 Hyclone 公司产品; 胎牛血清购自杭州江滨生物技术有限公司; MEM-EBSS 为北京协和医科大学细胞中心产品。

1.1.3 主要工具酶、试剂盒、试剂与耗材.

T4DNA 连接酶、限制性内切酶 *Nco* I、*Xho* I、*Xba* I、*Nde* I 购自 Promega 公司; Taq DNA 聚合酶购自清华天为生物公司。

IPTG 购自上海生工公司; 咪唑、Tripsin 及其抑制剂为 Promega 公司产品; 其他为市售进口或国产生化试剂。

96 孔细胞培养板, 美国 Costor 产品。

1.1.4 分离柱. Histrap™ Kit 购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司; Millipore 超滤器和超滤膜为 Millipore 公司产品。

1.1.5 实验动物. 豚鼠由北京市芭尔荪公司提供, 体重 200~250 g, 符合国家二级动物质量标准。

1.1.6 主要仪器. AkTA primer 纯化系统 (Amersham 产品); 高速台式冷冻离心机 6K-15 (Sigma 公司); 凝胶成像系统 Gel Doc 2000、电转仪 MicroPulser (Bio-Rad 公司)。

1.1.7 引物.

DT 扩增引物. 上游: 5' GCC ATG GGC GCT GAT GAT GTT GTT 3', 下游: 5' GC CTC GAG GCT CTT GAT TTC AAA AAA TA 3', 其中划线部分分别为 *Nco* I、*Xho* I 作用位点。

E154D 突变引物, 划线部分为突变点. 上游: 5' GAA TAT ATT AAT AAC TGG GAT CAG GCG AAA GCG TTA AGC 3', 下游: 5' GCT TAA CGC TTT CGC CTG ATC CCA GTT ATT AAT ATA TTC 3'。

E154R 突变引物, 划线部分为突变点. 上游: 5' GAA TAT ATT AAT AAC TGG CGT CAG GCG AAA GCG TTA AGC 3', 下游: 5' GCT TAA CGC TTT CGC CTG ACG CCA GTT ATT AAT ATA TTC 3'。

以上引物由上海博亚生物技术公司合成。

1.2 方法

1.2.1 表达载体的构建和重组白喉毒素的表达. 将经 PCR 扩增的白喉毒素基因连入表达载体, 构建重组表达载体 pET22b-DT, 在大肠杆菌 BL₂₁(DE₃) 中表达, 培养至 $A_{600} = 0.4 \sim 0.8$ 时, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 在 25℃ 诱导表达, 继续培养至 $A_{600} = 2.0$ 时, 收集菌体, 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶

电泳(SDS-PAGE), 检测白喉毒素的表达情况, 并进行纯化。

1.2.2 DT 催化区活性位点的量子化学计算. 依据白喉毒素的晶体结构在催化区中截取了由 S146~Q155 的 10 个氨基酸残基组成的完整 α 螺旋片段, 并利用 Insight II 软件包中的 Homology 模块, 通过同源建模的方法在 SGI 02 图形工作站上构建其三维结构, 为使计算结果更加符合实际情况, 片段的 N 端为—NH₂、C 端为—CONH₂, 不带电荷, 使原始构象和带电氨基酸数目在催化区中一致. 利用量子化学半经验 AM1 方法进行计算。

1.2.3 毒素基因的快速 PCR 定点突变. 以连入了 DT 基因的表达载体 PET22b(+)-DT 为模板, 分别以突变引物进行 PCR 反应, 按常规方法获得质粒, 用 373A 型 DNA 自动测序仪测序, 确定正确的突变体。

1.2.4 白喉毒素及其突变体的纯化. 采用 His- 亲和柱, 用 Primer 蛋白质纯化系统纯化菌体超声破碎上清中的表达蛋白, Zn²⁺ 螯合, 用结合缓冲液 (A: 20 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 8.0, 10 mmol/L 咪唑) 洗柱, 至 A_{280} 稳定后用洗脱缓冲液 (B: 20 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 8.0, 300 mmol/L 咪唑) 线性洗脱, 洗脱条件为: 0~100% B, 步长为 50 ml, 收集峰, 对收集各管 SDS-PAGE 鉴定, 采用 Folin 酚法测定蛋白质浓度。

1.2.5 重组基因表达毒素蛋白 N 端序列分析. Edman 降解法, 由北京大学蛋白质工程和植物基因工程国家重点实验室完成。

1.2.6 胰蛋白酶水解 DT. 采用不同比例的蛋白质量/酶量, 37℃ 反应, 每间隔 15 min 取 2 μ l 加入胰蛋白酶抑制剂, 反应 5 min 后, 取样行 SDS-PAGE, 确定最佳反应条件。

1.2.7 基因表达毒素对豚鼠的急性毒性. 在预试验的基础上选择 5 个剂量组, 用 PBS-BSA (20 mmol/L PB、20 mmol/L NaCl、pH 7.5、200 mg/L BSA) 配制毒素. 每组 6 只豚鼠, 雌雄各半, 腹腔注射染毒, 按剂量一次性给药后连续观察 14 天, 记录死亡情况. 用 Bliss 法计算毒素对豚鼠的 LD_{50} 。

1.2.8 基因表达 DT 及突变体的细胞毒性.

培养细胞至 96 孔板细胞孔的 80% 时, 翻板倒去培养液, 用培养液配制所需浓度的毒素, 梯度稀释, 每一梯度做 3~4 孔平行。

酸性磷酸酶法^[16]: 培养 24 h 后, 高浓度组细

胞出现细胞空胞, 用细胞洗涤液 (0.01 mol/L PBS, pH 7.0) 洗细胞, 加入磷酸酶底物 (10 nmol/L 磷酸对硝基二苯, 用含 1% Triton X-100 的 0.1 mol/L NaAc 缓冲液, pH 5.5 配制) 100 μ l/ 孔, 37 $^{\circ}$ C 0.5~2 h 后, 加入反应终止液(0.1 mol/L NaOH) 10 μ l/ 孔中止反应, 在 450 nm 外测定光吸收值. 计算细胞存活率, 用 Logit 法计算 IC_{50} .

2 结 果

2.1 白喉毒素基因的获取

白喉毒素基因位于白喉杆菌噬菌体基因组上. 早期的研究多是从细菌中提取噬菌体基因组, 用适当的酶切出包含白喉毒素基因的片段^[17, 18]. PCR 方法诞生后, 通过引物扩增目的片段成为首选, 但仍需提取噬菌体基因组^[19]. 本文采用直接菌落 PCR 方法, 从细菌菌落中直接扩增到了位于噬菌体基因组上的 DT 基因, 大小约 1.6 kb, 见图 1.

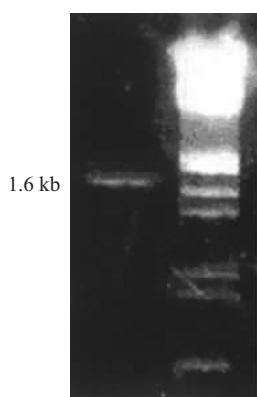


Fig. 1 Electrophoresis of PCR amplification of DT gene

2.2 表达载体的构建

将扩增到的白喉毒素基因连入表达载体 pET22b(+)中, 连入了目的基因的表达载体用 *Nco* I /*Nde* I 和 *Xho* I 双酶切后应能切出 1.6 kb 的 DT 基因片段和载体大片段, 据此可鉴别出阳性克隆, 图 2 是从一个阳性克隆中提取的质粒经双酶切后的 DNA 电泳图. 序列分析正确后, 构建了表达载体 pET22b-DT.



Fig. 2 Double restrictive analysis of positive plasmid

2.3 DT 催化区活性位点的量子化学分析

根据分子轨道理论, 前线轨道 (最高占据轨道 HOMO 和最低空轨道 LUMO) 及其附近的分子轨道对生物活性影响最大, 活性分子与受体生物大分子的相互作用主要发生在两者的前线分子轨道附近^[20,21]. HOMO 附近的占据轨道有利于提供电子, LUMO 附近的空轨道有利于接受电子. 根据 DT 的 X 射线晶体结构, 片段 S146~Q155 的氨基酸排列顺序及空间结构排布见图 3.

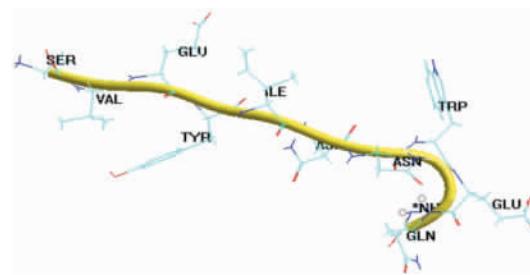


Fig. 3 The three-dimensional structure of S146~Q155 fragment

表 1 列出了 S146~Q155 片段经量子化学计算后得到的前线轨道附近分子轨道的分布情况. 各栏中第一行为轨道能级, 下面为该轨道主要成分. 紧靠 HOMO 的占据轨道为 HOMO(-1), 紧靠 LUMO 的空轨道为 LUMO(+1), 以此类推.

Table 1 The energy levels (ev) , main compositions of MOs near the frontier orbital

HOMO(-3)	HOMO(-2)	HOMO(-1)	HOMO	LUMO	LUMO(+1)	LUMO(+2)	LUMO(+3)
-4.034 7	-3.929 5	-3.741 4	-3.516 1	2.489 8	2.621 7	2.681 6	2.949 5
E154	E148	E154	E154	Y149	W153	Y149	N152

由表 1 可见, 该片段中谷氨酸 (E154 和 E148) 构成了 HOMO 附近占据轨道的主要成分, 在与受体作用时起着提供电子的作用, 其中 E154 的作用更大些. LUMO 附近空轨道主要是 Y149 和 W153, 在与受体作用时起着接受电子的作用. 由 HOMO 和 LUMO 分布图 (图 4) 中可以更形象、直观地看出, HOMO 分布在 E 中侧链的两个氧原子上, 表明这两个氧原子是负电中心. 而 LUMO 分布在 Y 中侧链的苯环上. 由于作为共轭体系的苯环中 π 电子作用产生的共轭效应, 使苯环表面电子云密度平均化, 苯环表面的游动电子云密度增加, 使苯环等芳香环能起到重要的电性作用, W 中的吲哚环也是如此. 在该片段中 Y 和 W 中的芳香环是接受电子的主要部位.

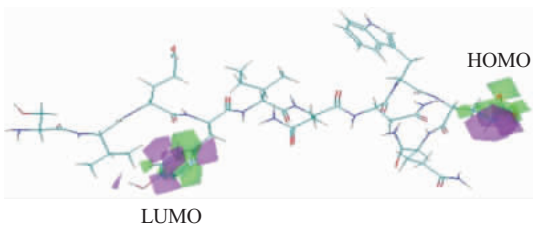


Fig. 4 HOMO and LUMO profile of S146~Q155 fragment

由于氨基酸的性质主要是由侧链基团决定的, 所以重点考察了重要氨基酸侧链的有关原子净电荷.

由表 2 可以看出, E 侧链中的氧原子带有大量负电荷, 是供电子主要部位, Y 中苯环和 W 中咪

Table 2 Net charge of side chain atoms or functional group

E148		E154		N152		Y149	W153
O(1)	O(2)	O(1)	O(2)	O	N	benzene ring	benzene ring
-0.58	-0.58	-0.59	-0.58	-0.36	-0.43	0.01	-0.08

*O(1), O(2) in E means O and =O in side-chain. O and N in N means O and N in amide group of side-chain.

唑环负电荷极少, 有利于接受电子. 由三维静电势图可见 (图 5), E148 和 E154 周围有强大的负电场, 是负电中心, 而 Y149 和 W153 则被正电势场包围, 是接受电子主要部位. 这与前线轨道附近的分子轨道分布情况是一致的.

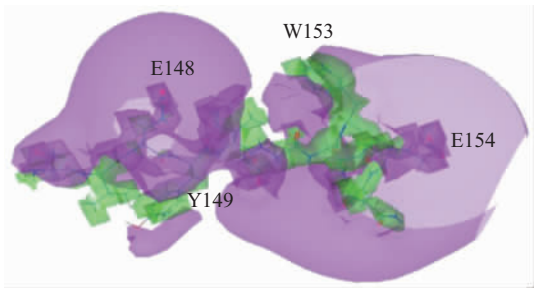


Fig. 5 Electrostatic potential of S146~Q155 fragment

由电子结构研究结果可以看出, 该片段的

E148、E154 在与受体结合时是提供电子的主要部位. Y149、W153 是接受电子的主要部位, 它们都是影响分子活性的重要氨基酸.

另外, 由构象图中可见 (图 3), E、Y、W 在空间排布上都是向外伸展的, 这种构象使它们在同受体相互作用时处于有利的空间位置.

在以上计算基础上, 作为主要的供电子部位, 选定 E154 为 DT 的重要活性位点进行突变研究.

2.4 E154 的定点突变

图 6 为快速 PCR 定点突变法获得的两个突变体, 序列测定结果与实验设计一致, 其序列分别为:

E154D, ...AAC TGG CGT CAG GCG AAA GCG TTA...

E154R, ...AAC TGG GAT CAG GCG AAA GCG TTA...

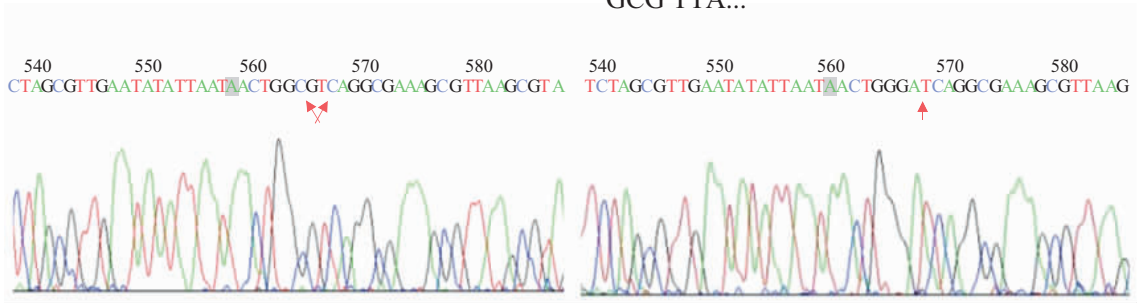


Fig. 6 The sequences of E154D and E154R mutants

2.5 DT 及其突变体 E154D 和 E154R 的表达与纯化

构建的表达载体 pET22b-DT、pET22b-E154D 和 pET22b-E154R 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中诱导表达, 经 SDS-PAGE 分析各部位样品, 表达产物主要存在于细胞质可溶部分 (图 7), 表达量约占菌体总蛋白的 20%。采用 Primer 纯化系统, 用 SDS-PAGE 分析层析结果 (图 8 和图 9). DT 经 1 次亲和层析就可达电泳纯, 纯化效率非常高. 纯化的 DT 转移到 PVC 膜上, 经考马斯亮蓝染色后, 测定目标蛋白带的 N 端氨基酸序列, 结果为 MGADDVV……, 与实验设计表达的 DT 毒素蛋白一致.

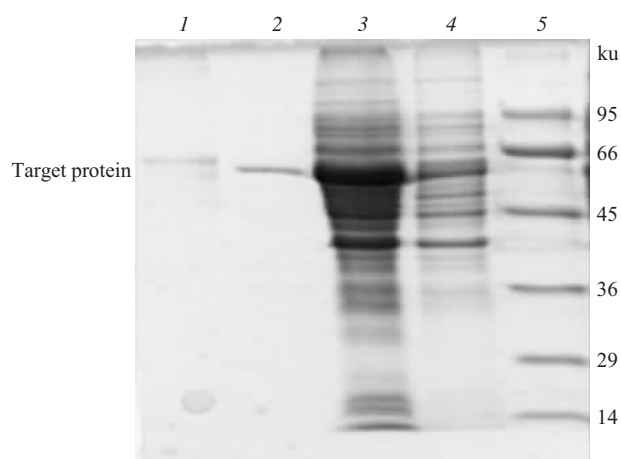


Fig. 7 Cellular localization of expressed DT

1: Culture supernatant; 2: Cello-periplasm; 3: Soluble portion of cytoplasm; 4: Insoluble portion of cytoplasm; 5: Molecular mass marker.

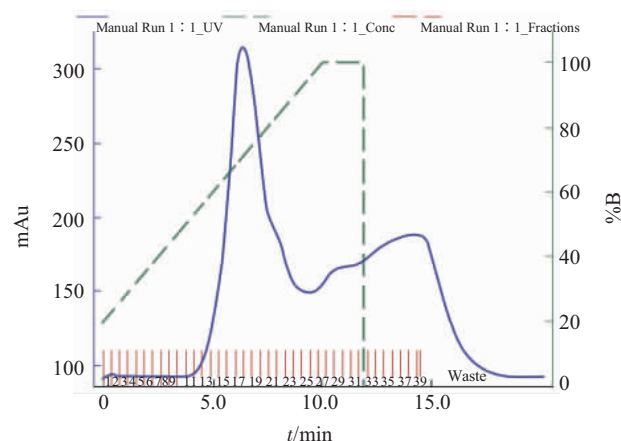


Fig. 8 Elution peak of DT on affinity chromatograph

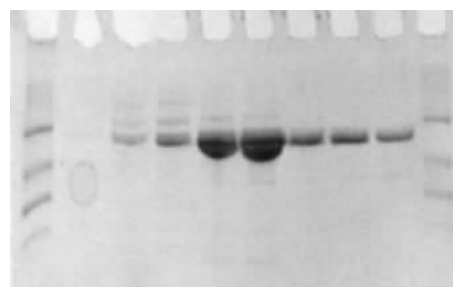


Fig. 9 SDS-PAGE of DT peak collection

2.6 表达 DT 的蛋白酶切

基因表达的重组白喉毒素是一条完整的单链, 是没有毒性的, 用胰蛋白酶消化形成缺口, 产生由二硫键连接的 A 链 (21 ku) 和 B 链 (37 ku), 方具有活性, 此处氨基酸残基为 Arg-Val-Arg-Arg || Ser, 形成二硫键的两个半胱氨酸间相隔 14 个氨基酸残基 (187~200).

采用 Folin- 酚法测定纯化后的 DT 浓度, 以不同蛋白质量 / 酶量 (重量比) 有限制性的水解 DT, 图 10 为蛋白质量 / 酶量为 4 000 : 1 时, 各时间点水解产物的 SDS-PAGE 结果.

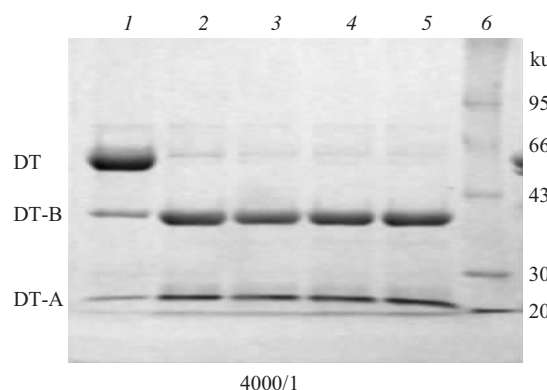


Fig. 10 SDS-PAGE profiles of a series of time digested DT

1~5: 0, 15, 30, 45 and 60 min, respective; 6: Molecular mass marker.

实验中对蛋白质量 / 酶量为 100 : 1、350 : 1、1 000 : 1、2 000 : 1、4 000 : 1 进行了试验, 蛋白质量 / 酶量为 100 : 1 时, 在 0 min 即混入胰蛋白酶后立刻取样, 表达 DT 已几乎不可见, 15 min 时 DT-B 大量被水解, 350 : 1 时在 45 min 时 DT-B 被水解, 2 000 : 1 与 4 000 : 1 的水解结果相差不大, 但为了更好地控制酶量和反应速率, 在试验的基础上选定 4 000 : 1 (蛋白质 / 酶, 重量比), 60 min 为酶水解的条件.

对酶解后的 DT 行 SDS-PAGE, 经转 PVC 膜后, 测定酶切大片段即 DT-B 的 N 端氨基酸序列, 为 SVGSSLSCIN·····, 与 DT-B 一致, 且不加还原剂时电泳结果只有一条分子质量为约 60 ku 的条带, 证明本实验设计的酶切方法有效, 能够获得正确的带“缺刻”的 DT 分子.

2.7 重组基因表达 DT 的生物活性

2.7.1 重组基因表达 DT 对豚鼠的急性毒性.

DT 毒性有明显的种属特异性, 对人的毒性最强, 其次是对猴子等灵长类动物, 对啮齿类动物的毒性较小. 在不同品系的小鼠、大鼠和豚鼠中, 豚鼠较为敏感, 因此本实验测定了基因表达的 DT 及其突变体 E154D、E154R 对豚鼠的急性毒性.

- a. DT 及 E154DE、E154R 对豚鼠的急性毒性.
- 豚鼠 DT 中毒的毒性症状为: 高剂量组动物给

药第 2 天活动迟缓, 出现死亡, 濒死动物外观无力, 口眼无血色, 唇黄白, 气喘, 部分动物一侧脸颊肿大, 眼分泌物多, 失明, 死亡时体重与给药时相比下降 60~70 g.

濒死动物解剖可见胆囊大, 壁薄, 胆汁多且色黄, 胃、肠胀气, 内壁有出血点、脱落及损伤 (图 11), 腹内壁严重充血.

E154D 和 E154R 对豚鼠的毒性症状和病理解剖症状与 DT 的染毒症状基本一致, 动物的死亡时间跨度较大, 从染毒后第 2 天至第 12 天均有死亡.

染毒不同剂量 DT 和突变体豚鼠(ig)的死亡率见表 3,

根据表 3 的数据采用 Bliss 法以效应 (*E*) 对剂量的对数 (*lgD*) 作图, 拟合直线方程, 结果列于表 4.

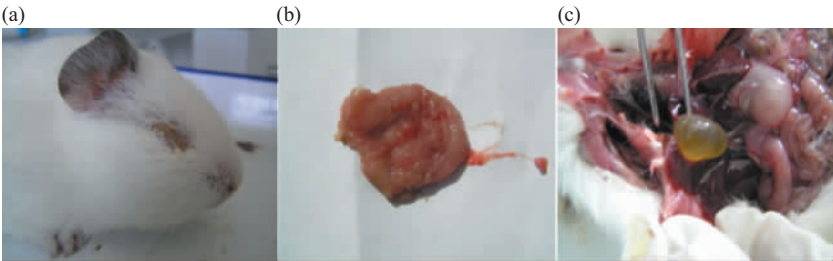


Fig. 11 The symptoms and pathology anatomise on DT ig Guinea pigs
(a)Symptoms of face and eyes. (b) Hemorrhage spot of stomach inner-wall. (c) Intumescence of cholecyst.

Table 3 Guinea pigs mortality rate by various doses DT, E154D and E154R

DT		E154D		E154R	
μg/kg	death/sum	μg/kg	death/sum	μg/kg	death/sum
1.6	6/6	1.25	2/2	3.5	2/2
1.2	5/6	1.00	6/8	2.0	2/4
1.0	4/6	0.80	4/8	1.5	0/4
0.8	1/6	0.64	2/8		
0.4	0/6	0.50	0/2		

Table 4 Statistics results of DT and mutants' LD₅₀

Toxin	Formula	<i>r</i> (<i>P</i>)	<i>LD</i> ₅₀ ± <i>SD</i> (μg/kg)	95% Confidence interval (μg/kg)
DT	<i>E</i> = 5.246 + 11.601×lg <i>D</i>	<i>r</i> = 0.998 <i>P</i> < 0.01	0.952 ± 0.0292	0.769~1.179
E154D	<i>E</i> = 5.788 + 8.109×lg <i>D</i>	<i>r</i> = 0.989 <i>P</i> < 0.01	0.799 ± 0.0328	0.629~1.017
E154R	—	—	—	—

DT对豚鼠 ig 染毒的 LD₅₀ 为 0.952 μg/kg, 与文献报道基本一致, 说明基因重组表达的 DT 与天然 DT 的毒性相同或相似; E154D 对豚鼠的 LD₅₀ 为 0.799 μg/kg, 表明对整体动物的毒性略有增加;

E154R 的染毒剂量 1.5 μg/kg 组动物无死亡, 从数据上看 LD₅₀ 约在 2.0 μg/kg 左右, E154R 对豚鼠的毒性降低约 50%.

b. DT 对小鼠腹腔染毒的急性毒性.

以 10、50 和 100 $\mu\text{g/只}$ 的冲剂量给药, 2 天内高剂量(100 $\mu\text{g/只}$)组动物死亡, 解剖可见肠黏膜广泛性充血, 眼球突出黑紫, 失明, 面部血肿 (图 12); 给药 8 天后 50 $\mu\text{g/只}$ 组死亡, 眼睛混浊失明, 不能睁开(图 12), 肝、胆、胃有病变; 10 $\mu\text{g/只}$ 组除给药当天长时间闭目外, 无其他明显症状.



Fig. 12 The toxic symptoms of DT ig exposure in mice

2.7.2 重组基因表达 DT 的细胞毒性.

研究了 DT 及其突变体 E154D 和 E154R 对非洲绿猴肾细胞、BS-C-1、非洲黑人宫颈癌细胞 HeLa、人肝癌细胞 SMMC-7721、人肺癌细胞

PLA-801D 和中国仓鼠卵巢细胞 CHO-K1 的细胞毒性, 采用 Logit 法以 $\lg[I/(100-I)]$ 对浓度的对数 $\lg C$ 作图, 拟合直线方程(图 13), 结果见表 5, DT 及突变体对 5 种细胞的 IC_{50} 统计分析结果列于表 6.

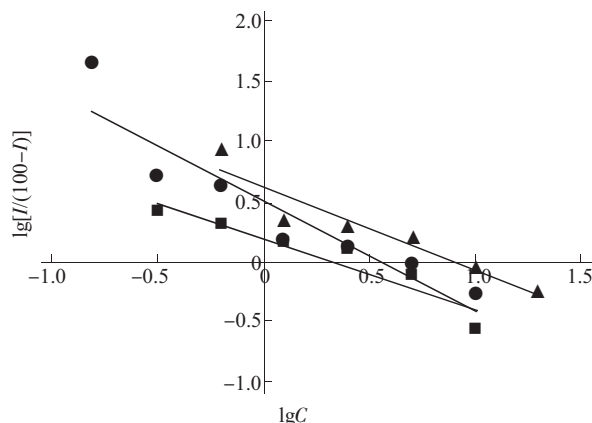


Fig. 13 Logit chart of cytotoxicity on DT and mutants to BS-C-1 cell

●—●: DT, $y = 0.5098 - 0.9187x$; ■—■: E154D, $y = 0.1942 - 0.5907x$; ▲—▲: E154R, $y = 0.6192 - 0.6846x$.

Table 5 Cytotoxicity in five kinds of cell lines by DT and mutants

Toxin	$IC_{50}(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ / relative effect*				
	BS-C-1	HeLa	SMMC	PLA	CHO-K1
DT	3.589 /1	132.94 /37.04	136.43 /38.01	33.32 /9.28	1709 /476.18
E154D	2.13 /1.69	127.30	110.19	18.70	2761
E154R	8.03 /0.45	156.87	117.20	86.77	4381

*: Relative effect means the IC_{50} ratio of DT to BS-C-1 cell to DT to different cells or that of DT to BS-C-1 cell to mutants to BS-C-1 cell.

Table 6 Statistics results of DT and mutants' IC_{50}

Toxin	Cell line	Formula	r (P)	$IC_{50} \pm \text{SD} / (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	95% Confidence interval / ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
DT	BS-C-1	$y = 0.510 - 0.919x$	$r = 0.934$ $P < 0.01$	3.589 ± 0.130	$7.724 \sim 1.667$
	HeLa	$y = 0.781 - 0.368x$	$r = 0.957$ $P < 0.01$	132.937 ± 0.171	$348.558 \sim 50.700$
	SMMC	$y = 5.477 - 2.566x$	$r = 0.857$ $P < 0.05$	136.429 ± 0.177	$423.324 \sim 43.969$
	PLA	$y = 1.062 - 0.698x$	$r = 0.964$ $P < 0.01$	33.315 ± 0.073	$57.057 \sim 19.453$
	CHO-K1	$y = 0.310 - 1.333x$	$r = 0.880$ $P < 0.05$	$1.709 \pm 0.159^*$	$4.718 \sim 0.619^*$
E154D	BS-C-1	$y = 0.194 - 0.591x$	$r = 0.950$ $P < 0.01$	2.131 ± 0.085	$3.687 \sim 1.235$
	HeLa	$y = 2.585 - 1.228x$	$r = 0.977$ $P < 0.01$	127.301 ± 0.098	$238.273 \sim 68.012$
	SMMC	$y = 2.171 - 1.063x$	$r = 0.991$ $P < 0.01$	110.194 ± 0.033	$140.348 \sim 86.518$
	PLA	$y = 0.516 - 0.406x$	$r = 0.956$ $P < 0.01$	18.697 ± 0.090	$33.240 \sim 10.517$
	CHO-K1	$y = 0.999 - 2.266x$	$r = 0.857$ $P < 0.05$	$2.761 \pm 0.214^*$	$10.862 \sim 0.702^*$
E154R	BS-C-1	$y = 0.619 - 0.685x$	$r = 0.952$ $P < 0.01$	8.026 ± 0.100	$15.231 \sim 4.229$
	HeLa	$y = 1.730 - 0.788x$	$r = 0.983$ $P < 0.01$	156.867 ± 0.060	$224.218 \sim 109.747$
	SMMC	$y = 3.439 - 1.662x$	$r = 0.988$ $P < 0.01$	117.200 ± 0.070	$177.090 \sim 77.565$
	PLA	$y = 1.501 - 0.775x$	$r = 0.929$ $P < 0.01$	86.772 ± 0.128	$197.022 \sim 38.216$
	CHO-K1	$y = 0.753 - 1.174x$	$r = 0.950$ $P < 0.01$	$4.381 \pm 0.132^*$	$11.512 \sim 1.667^*$

* The unit of IC_{50} in CHO-K1 is mg/L.

从细胞的毒性数据看, 以 DT 对 BS-C-1 细胞为标准, 突变体 E154D、E154R 的细胞毒性分别为 DT 的 1.69、0.45 倍, 与预期相符; 从细胞的敏感性来看, BS-C-1 细胞最敏感, 其次为 PLA、HeLa、SMMC 细胞, CHO-K1 细胞最不敏感, 不同细胞对 DT 的敏感性为 1:9:37:38:476, DT 及其突变体对 3 种来源细胞的毒性变化趋势与报道的对整体动物毒性的变化趋势相同。

3 讨 论

具有生物活性的白喉毒素, 由具有催化活性的 A 链和能够识别和结合细胞表面受体并能够形成跨膜通道的 B 链组成, 两链间以二硫键连接. 基因工程表达的毒素是一条完整的链, 因而需要对其进行有限度的酶切, 在 193 位精氨酸处易被蛋白酶消化形成缺口. 用胰蛋白酶或类似的酶可识别此位点, 但长达 535 个氨基酸残基的白喉毒素分子中胰蛋白酶可切割的位点很多, 因而需要摸索最佳的酶量和反应时间, 避免过多的错误切割, 得到尽量多的带“缺口”的毒素. 另外, 实验中发现, 表达毒素在 4℃、PBS 中保存时有很大部分自然水解为以二硫键相连的 DTA 及 DTB, 可对小鼠造成毒性; 而保存于 4℃、50 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L EDTA 中的毒素在保存半年后只有部分自然水解(图 14). 这说明 DTA 和 DTB 之间的蛋白酶识别位点是相当不稳定的, 可被溶液中残留的少量蛋白酶水解, 而 EDTA 可抑制此酶的作用。

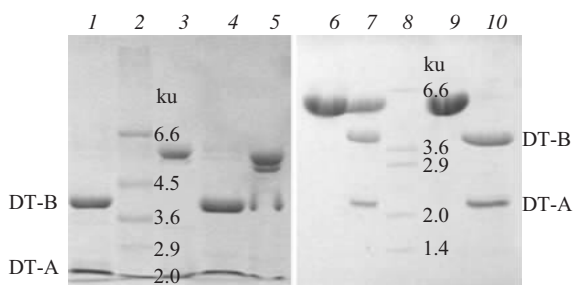


Fig. 14 SDS-PAGE of DT hydrolyzed in nature and digested by protease

1,4,7,10: Samples with DTT; 3,5,6,9: Samples without DTT; 1,3: DT in PBS; 4,5: E154D digested by protease; 6,7: E154R in Tris-HCl, EDTA after half a year; 9,10: Samples in line 6 digested by protease.

在重组表达白喉毒素对小鼠和豚鼠的急性毒性试验中, 数只动物出现了脸颊或单侧淋巴结肿大、失明等症状, 解剖可见组织变黑坏死, 这些症状在文献中未见报道, 其作用机理尚待研究, 可能是淋

巴细胞受损造成淋巴循环受阻, 导致了组织病变和坏死. 白喉毒素的毒性具有明显的种属差异, 人最为敏感, 其次为灵长类动物, 啮齿类动物不敏感, 但啮齿类动物豚鼠相对较敏感, 从实验结果可知, 0.8 $\mu\text{g/kg}$ 的剂量就可引起豚鼠死亡, 而小白鼠的最小有作用剂量约为 10 $\mu\text{g/只}$ (约相当于 400 $\mu\text{g/kg}$). BS-C-1 细胞对白喉毒素的敏感度比 HeLa 细胞高 37 倍, 比 CHO-K1 高约 500 倍, 与文献报道的物种敏感性相符, 豚鼠腹腔染毒的急性毒性实验结果也与文献值一致, 说明基因表达的毒素具有与天然毒素相同的生物活性。

Killeen 等^[20]用基因定点突变的方法证明了 Glu148 位于 DT 的催化活性中心, 是 A 片段 ADPRT 酶活性的关键氨基酸, 删除 Glu148 后, ADPRT 活性下降到 $1/10^4$, 将 Val 147 突变为 Glu 或缺失掉 Glu148 前的 5 个氨基酸残基, 使 Glu142 与 Tyr149 相连, 则可恢复部分 ADPRT 活性, 这说明处于催化中心裂隙中的 Glu 是酶拥有催化活性的关键氨基酸。

相对于同是 HOMO 轨道主要组成的 Glu148, 从静电势上说, E154 上氧原子具有更强的电负性, 更有利于成为催化活性中心的供电子体, 从轨道能级上看, E154 具有更稳定的能量值, 作为催化活性中心更能稳定存在, 从量子化学计算结果判断对于 DT 的活性可能更为重要。

用酸性更强的天冬氨酸取代 154 位谷氨酸, 毒性有一定程度的增加, 而用碱性精氨酸取代大幅度降低了活性, 这一结果可用量子化学计算结果予以解释. E154 的侧链氧原子的强负电势在催化作用中起供电子的作用, 用负性更强的天冬氨酸取代可提高供电子能力, 而将其突变为带正电荷的精氨酸, 供电子能力降低, 因而引起了活性的相应改变. 另外, 氨基酸残基空间构型的变化可能会影响催化裂隙的空间结构, 对生物活性的影响也是至关重要的。

Wilson 等^[14]对 E148 的突变研究结果表明, E148D、E148Q、E148S 的 ADPRT 活性都有大幅度下降, 其 NAD-糖苷酶活性除 E148S 下降了 90%外, E148D、E148Q 略有增加, 与 NAD⁺的结合能力却大不相同, E148D 下降了 89%, 而另两个突变体几乎完全检测不到结合能力, 表明谷氨酸侧链的羧基基团在 ADPRT 活性和与 NAD⁺的结合中起关键性作用, 但它们对于 NAD-糖苷酶活性却不是必需的. 他们的研究提示对 E154 还需进行进

一步的酶学活性研究, 以确定其相关基团的作用.

参 考 文 献

- Freeman V J. Studies on the virulence of bacteriophage-infected strains for corynebacterium diphtheria. *J Bacteriol*, 1951, **61** (6): 675~678
- Lennox E S, Kaplan A S. Action of diphtheria toxin on cells cultivated *in vitro*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1957, **95** (4): 700~702
- Placido S C, Evans D G. The action of diphtheria toxin on tissue cultures and its neutralization by antitoxin. *Brit J Exp Path*, 1957, **38** (6): 644~649
- 雷柞荣. 细菌毒素分子生物学, 北京: 中国科学技术出版社, 1993. 14~120
Lei Z R. *Molecular Biology in Bacteriotoxin*. Beijing: China Science Technique Press. 1993. 14~120
- Misler S. Gating of ion channels made by a diphtheria toxin fragment in phospholipid bilayer membranes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, **80** (14): 4320~4324
- Kagan B L, Finkelstein A, Colombini M. Diphtheria toxin fragment forms large pores in phospholipid bilayer membranes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78** (8): 4950~4954
- Bell C E, Eisenberg D. Crystal structure of diphtheria toxin bound to nicotinamide adenine dinucleotide. *Biochemistry*, 1996, **35** (4): 1137~1149
- Bell C E, Eisenberg D. Crystal structure of diphtheria toxin bound to nicotinamide adenine dinucleotide. *Adv Exp Med Biol*, 1997, **419**: 35~43
- Blanke S R, Huang K, Wilson B A, *et al.* Active-site mutations of the diphtheria toxin catalytic domain: role of histidine-21 in nicotinamide adenine dinucleotide binding and ADP-ribosylation of elongation factor 2. *Biochemistry*, 1994, **33** (17): 5155~5161
- Lodaya R, Blanke S R, Collier R J, *et al.* Photoaffinity labeling of diphtheria toxin fragment A with 8-azidoadenosyl nicotinamide adenine dinucleotide. *Biochemistry*, 1999, **38** (42): 13877~13886
- Dolan K M, Lindenmayer G, Olson J C. Functional comparison of the NAD binding cleft of ADP-ribosylating toxins. *Biochemistry*, 2000, **39** (28): 8266~8275
- Blanke S R, Huang K, Collier R J. Active-site mutations of diphtheria toxin: role of tyrosine-65 in NAD binding and ADP-ribosylation. *Biochemistry*, 1994, **33** (51): 15494~15500
- Fu H, Blanke S R, Mattheakis L C, *et al.* Selection of diphtheria toxin active-site mutants in yeast. Rediscovery of glutamic acid-148 as a key residue. *Adv Exp Med Biol*, 1997, **419**: 45~52
- Wilson B A, Reich K A, Weinstein B R, *et al.* Active-site mutations of diphtheria toxin: effects of replacing glutamic acid-148 with aspartic acid, glutamine, or serine. *Biochemistry*, 1990, **29** (37): 8643~8651
- Zdanovskaia M V, Zdanovsky A G, Yankovsky N K. Diphtheria toxin NAD affinity and ADP ribosyltransferase activity are reduced at tryptophan 153 substitutions for alanine or phenylalanine. *Res Microbiol*, 2000, **151** (7): 557~562
- 朱立平, 陈学清主编. 免疫学常用实验方法, 北京: 人民军医出版社, 2000. 342~358
Zhu L P, Cheng X Q. *Common Used Empirical Method in Immunology*. Beijing: People's Military Surgeon Press, 2000. 342~358
- Greenfield L, Bjorn M J, Horn G, *et al.* Nucleotide sequence of the structural gene for diphtheria toxin carried by corynebacteriophage β . *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, **80** (22): 6853~6857
- Michel K, Francis D, Nicole C, *et al.* Nucleotide sequence and expression of the diphtheria tox228 gene in *Escherichia coli*. *Science*, 1983, **221** (4613): 855~858
- 张建新, 李 晶, 张宝云, 等. 中国株白喉杆菌白喉毒素全基因编码序列的克隆及其在大肠杆菌中的高效表达. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1995, **9** (4): 334~348
Zang J X, Li J, Zhang B Y, *et al.* *J Chin Exper Clin Virol*, 1995, **9** (4): 343~348
- Richards W G. *Quantum Pharmacology*. 2nd. London: Butterworth & Co Ltd., Butterworth, 1983. 153
- Chen C Y, Li L M. Structure-activity relationships and the mechanism of analgesia of the analgesic drug 3-methyl-fentanyl and its anaogs. *Int J Quantum Chem*, 1983, **23** (4): 1597~1608
- Killeen K P, Escuyer V, Mekalanos J J, *et al.* Reversion of recombinant toxoids: mutations in diphtheria toxin that partially compensate for active-site deletions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (13): 6207~6209

Mutations in E154 of Diphtheria Toxin (DT) and Their Biologic Activity*

GAO Chuan**, WANG Hui-Fang, ZHANG Jing, SONG Yun-Yang, HU Ya-Lan

(The Research Institute of Pharmaceutical Chemistry, Beijing 102205, China)

Abstract According to the results of quantum chemistry calculation and the present research status in the relationship between the structures and the functions of DT, the E154 in DT catalyzing domain was mutated to aspartic acid and arginine in order to study the effects of the alteration on the biological activities. By means of gene site-direct mutation, two mutated genes were prepared and the high performance expression was obtained in *E.coli* system. The results of toxicity studies indicated that the acute toxicity in guinea pig and cytotoxicities of

mutant E154D increased slightly in compared with those of recombination wild toxin, and contrarily, those of E154R decreased obviously.

Key words diphtheria toxin, quantum chemistry, mutant, LD_{50} , IC_{50}

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30472212).

**Corresponding author . Tel: 86-10-66758323-801, E-mail: g.ch.chuan@263.net

Received: January 19, 2006 Accepted: March 14, 2006