

海葵毒素多肽的分离和初步表征

嵇如朋¹⁾ 付宏征¹⁾ 仲崇波²⁾ 王晓良²⁾ 林文翰^{1)*} 张礼和¹⁾

(¹⁾北京大学医学部天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100083

²⁾中国医学科学院药物研究所, 北京 100050)

摘要 经冻融法提取, 丙酮沉淀, SP Sephadex C 25 强离子交换和 HPLC ODS C₁₈ 反相色谱层析, 从海葵 *Actinia cari* 中提纯到两个新的毒素多肽, 命名为 RSAP I 和 RSAP II, 经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 鉴定 RSAP I 和 RSAP II 均为单一成分, 相对分子质量分别为 5 008 和 4 992. 初步钠通道药理学实验表明, RSAP I 和 RSAP II 对豚鼠心室肌细胞钠通道表现出活性, RSAP I 使钠离子内流增加, 起开放作用; RSAP II 使钠离子内流减少, 起阻滞作用. 二者的圆二色谱均表现为 100% β 转角.

关键词 海葵, 海葵毒素, 分离纯化

学科分类号 R282.77

海葵是一种海洋腔肠动物, 其触手及身体中富含各种有毒蛋白质和多肽^[1], 当受到机械或化学刺激时, 毒素就被释放出来, 海葵就是籍此毒素进行防御和捕食^[2]. 目前一系列具有神经毒^[2]和心脏毒^[3~5]的海葵多肽已经被分离出来. 现代药理学研究表明^[6~8], 海葵多肽与可兴奋细胞膜上电压依赖性钠通道特异性结合, 延长去极化过程中钠通道的开放状态, 致使钠离子内流增加. 虽然这种生理学作用与蝎毒类似, 但是鉴于其高亲和性和可区分神经、心脏和骨骼肌等不同钠通道形式的功能, 海葵毒素是更有价值、更具吸引力的钠通道研究工具药^[9].

海葵毒素多肽是一类相对分子质量范围在 3 000~6 000、由 2~3 个二硫键交联着的单链碱性分子, 基于其一级结构可分为三种类型^[3,7]. 但以后分离出来的 calitoxin^[8]、BTTX II^[10] 和 AEX II、AEX III^[11] 与经典的三种类型有较大不同, 代表着新颖结构类型的海葵多肽毒素; 另外作用于钾通道的海葵毒素多肽^[12] 也被分离出来, 这都体现了海葵多肽毒素的多样性. 尽管海葵是我国丰富的近海动物之一, 但是海葵多肽毒素的分离和表征尚未见报道, 为开发利用祖国海洋生物资源, 我们对南海玫瑰海葵进行了研究, 以期得到结构类型新颖和作用机理独特的海葵毒素多肽.

海葵毒素多肽富集在 50%~80% 的丙酮沉淀中^[13], 因此我们采用冻融法提取, 丙酮分级沉淀, SP Sephadex C-25 层析分离和 HPLC ODS C₁₈ 制备了两个新的海葵多肽 RSAP I 和 RSAP II, 这在海

葵多肽毒素属首次报道, 并对其物理化学性质进行了初步表征, 初步钠通道药理学实验结果表明海葵多肽 RSAP I 和 RSAP II 对豚鼠心肌钠通道表现出活性.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 海葵: 玫瑰海葵 *Actinia cari* (采自三亚), 单体海葵, 圆柱形, 长 10 cm, 直径 4 cm, 触手及口盘部分绿色, 吸盘部分肉色, 两者之间为红色.

1.1.2 动物: 体重 200~250 g 左右, 雄性豚鼠由中国医学科学院实验动物中心.

1.1.3 试剂: 牛血清白蛋白为 Sigma 公司产品; SP Sephadex G-25 为 Pharmacia 公司产品; 乙腈为 Tedia 产品; 其余试剂为国产分析纯产品.

1.1.4 仪器: BSZ-100A 自动部分收集器 (上海沪西分析仪器厂); DYY-III 8A 电泳仪 (北京六一仪器厂); 高效液相色谱仪: 分析半制备型 Alltech 高效液相系统 (4426 HPLC pump, Alltech UV-Vis 200 Detector), HPLC 柱 Alltech ODS C₁₈, 4.60 mm × 250 mm, 5 μ m; 离心机为 Beckman 公司产品; 紫外分光光度计 (北京第二光学仪器厂); LGJ0.5-II 冷冻干燥机 (军事医学科学院实验仪器厂); LDI-1700 基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱仪 (Linear Science Inc.) (TOF-MS); 氨基酸

* 通讯联系人.

Tel: 010-62062210, E-mail: whlin@mail.bjmu.edu.cn

收稿日期: 2000-09-11, 接受日期: 2000-11-03

自动分析仪 (日立 835-50 型); EPC-7 型膜片钳放大器 (德国 list 公司); J720 圆二色仪 (JAC 公司产品).

1.2 方法

1.2.1 粗海葵毒素多肽的提取和制备: 四个玫瑰海葵 (约 1 kg) 放在烧杯中, 覆以蒸馏水, 置于 -20°C 低温冰柜中冷冻, 经三轮冰冻-融化循环后, 纱布过滤弃去海葵体, 滤液置 -20°C 低温冰柜中备用. 上述提取液, 分别用 20%、50%、80% 丙酮分级沉淀.

1.2.2 SP Sephadex C-25 强阳离子柱层析: 将 50%~80% 丙酮沉淀 0.5 g 溶于 0.01 mol/L 的 NH_4OAc 缓冲液 (pH 4.5) 中, 上 SP Sephadex C-25 柱. 该柱预先用 0.01 mol/L 的 NH_4OAc 缓冲液 (pH 4.5) 平衡. 上样完毕后用 0.01 mol/L 的 NH_4OAc 缓冲液 (pH 4.5) 淋洗, 再用 0.20 mol/L 的 NH_4OAc 缓冲液 (pH 4.5), 1 mol/L 的 NH_4OAc 缓冲液 (pH 4.5) 梯度洗脱, 最后用 1 mol/L 的 NH_4OAc 缓冲液 (pH 5.2) 洗脱.

1.2.3 反相色谱制备: 收集 SP Sephadex C-25 柱峰 I, 上 Sephadex G-25 柱, 1 mmol/L HCl 淋洗脱盐, Sephadex G-25 柱脱盐样品最后经 HPLC ODS C_{18} 柱制得纯品 RSAP I 和 RSAP II, HPLC ODS C_{18} 柱先用 10% 的乙腈水溶液 (含 0.1% TFA) 平衡, 再线性梯度洗脱 (30 min 内乙腈浓度由 10% 递增到 35%, 然后 3 min 之内递增到 99%, 维持在 99% 3 min 冲洗层析柱, 再 3 min 之内回到 10% 平衡层析柱), 流速恒定 1 ml/min.

1.2.4 纯度鉴定及相对分子质量的测定: SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 采用 Tris-HCl 缓冲系统, 用 18% 的分离胶, 3% 的浓缩胶, 电泳完毕用考马斯亮蓝 R250 常温染色 1 h, 再用 7% 甲醇、7% 乙酸水溶液脱色. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS): 用二次蒸馏水将样品配成 1 g/L 溶液, 以 α -氰基肉桂酸 (α -cyanocinnamic acid, CCA) 为基质, 质谱信号为单次扫描累加测得.

1.2.5 氨基酸组成分析: 用 5.7 mol/L 的盐酸水解, 水解后的样品用日立 835-50 型氨基酸自动分析仪分析.

1.2.6 钠通道药理学实验: 雄性豚鼠 (约 200~250 g), 处死后速取心脏, 经 Langedoff 模型逆行灌注, 分别经无钙液及酶液灌注, 急性分离出单个适合膜片钳实验的心室肌细胞, 用膜片钳全细胞记

录模式研究钠电流的变化. 在室温 ($22\sim 26^{\circ}\text{C}$) 下用膜片钳全细胞记录模式研究去极化激活的钠通道电流. 记录电极由内径为 1.5 mm 硼酸盐玻璃毛细管, 经日本 Narishige PP-83 微电极拉制仪制成, 阻抗 $2\sim 5\text{ M}\Omega$. 信号经 Ag/AgCl 电极引导, 由膜片钳 (Axon Instruments) 放大器 (L/M EPC-7, 德国) 放大. 实验过程由计算机软件 pCLAMP5.51 (Axon Instrument, 美国) 控制, 通过放大器及 A/D、D/A 转换 (Axon TL-1, 美国) 控制刺激的连续发放、信号采集和数据分析, 并将信号存储于计算机硬盘中.

细胞外液组成为: NaCl 50 mmol/L, TEA-HCl 100 mmol/L, KCl 5.4 mmol/L, MgCl_2 1 mmol/L, 葡萄糖 10 mmol/L, HEPES 5 mmol/L, CaCl_2 1.8 mmol/L.

细胞内液组成为: KCl 140 mmol/L, MgCl_2 0.5 mmol/L, EDTA 10 mmol/L, HEPES 10 mmol/L. 用双蒸水配制, KOH 调节 pH 值至 7.20, 微孔滤膜 ($0.22\text{ }\mu\text{m}$) 过滤后, 分装在 Eppendorf 管中, 0.8~1 ml/管, 置于 -20°C 下冷冻, 实验当天取出, 自然融化.

1.2.7 圆二色谱测定: 50 μg 克样品溶于 1 ml 蒸馏水中, 25°C 下在 190~250 nm 范围内测定 CD 谱, 累加两次.

2 结果和讨论

玫瑰海葵全体经三轮冻融提取、丙酮分级沉淀、SP Sephadex C-25 强阳离子柱层析分离、HPLC

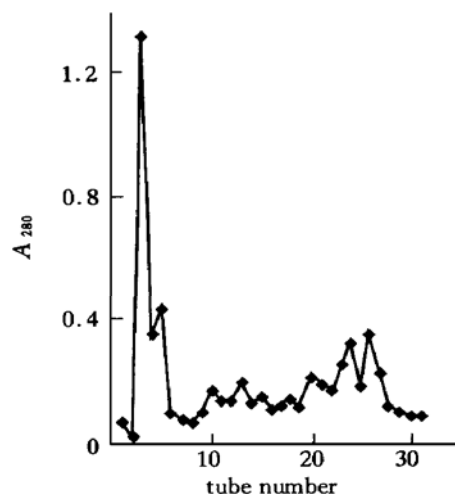


Fig. 1 Isolation of RSAP I and RSAP II by sulfurpropyl-Sephadex ion-exchange chromatography
eluting gradient, 0.01 mol/L ammonium acetate, pH 4.5; following 0.20 mol/L ammonium acetate, pH 4.5; following completion of gradient, column was washed with 1.0 mol/L ammonium acetate, pH 5.2.

ODS C₁₈柱进一步分离纯化, 便可得到纯品海葵毒素多肽 RSAP I 和 RSAP II (图 1 和图 2).

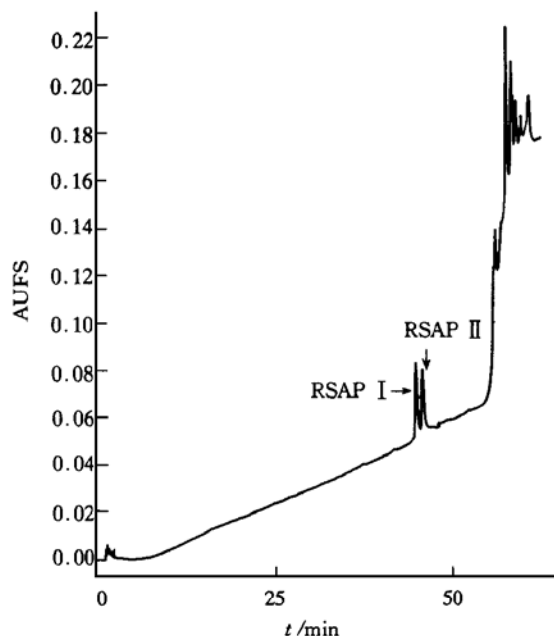


Fig. 2 Isolation of RSAP I and RSAP II by reverse phase HPLC

Peak 1 obtained from the column SP Sephadex G-25 was subjected to HPLC on a Alltech column (4.6 mm × 250 mm). The column was eluted with a gradient of acetonitrile in 0.1% TFA.

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 和氨基酸组成分析结果表明, RSAP I、RSAP II、RSAP III 和 RSAP IV 是从海葵

中发现的新的多肽。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 在海葵多肽的研究中具有重要应用, 一方面提供纯度信息, 另一方面可以给出比较精确的相对分子质量数据, 误差很小。与文献 [3] 比较发现, 已知海葵多肽毒素的相对分子质量与 RSAP I 和 RSAP II 相差较大, 只有 Ax III 与 RSAP II 的相对分子质量范围比较接近, 但是它们的氨基酸组成相差较大 (表 1): 最明显的区别是, RSAP II 的氨基酸组成中没有脯氨酸, Ax III 却有四个脯氨酸; RSAP II 的氨基酸组成中具有四个苯丙氨酸和一个酪氨酸, 而 Ax III 却没有苯丙氨酸和酪氨酸。因此我们认为 RSAP I 和 RSAP II 可能是从海葵中发现的新的多肽。

2.1 纯度鉴定和相对分子质量测定

反相色谱制备的 RSAP I 和 RSAP II (图 2) 经基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 鉴定均为单一成分 (图 3), 相对分子质量分别为 5 008 和 4 992, 质谱图上 5 009 m/z 为 $[M+H]^+$ 峰, 2 507 m/z 为 $[M+2H]^{2+}$ 双电荷峰, 10 017 m/z 为 $[2M+H]^+$ 二聚体峰, 14 981 m/z 为 $[3M+H]^{3+}$ 三聚体峰; RSAP IV 相对分子质量为 4 992, 质谱图上 4 993 m/z 为 $[M+H]^+$ 峰, 2 499 m/z 为 $[M+2H]^{2+}$ 双电荷峰, 9 999 m/z 为 $[2M+H]^+$ 二聚体峰, 15 000 m/z 为 $[3M+H]^{3+}$ 三聚体峰。

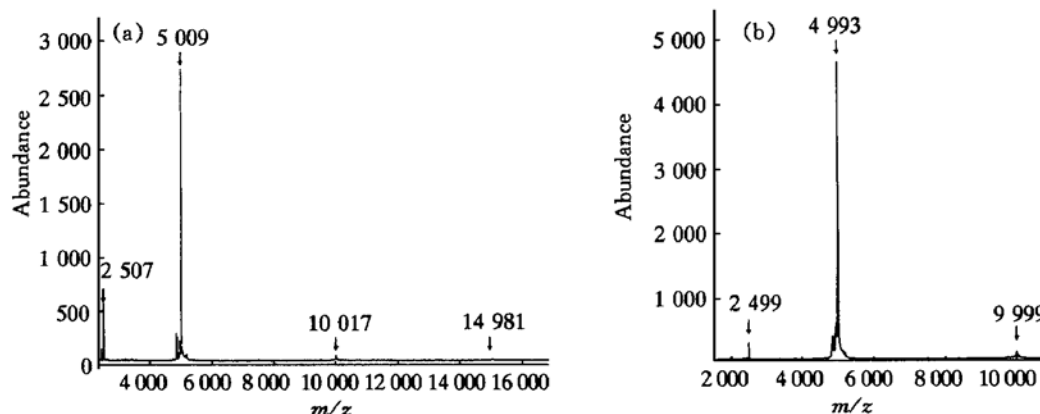


Fig. 3 MALDI-TOF/MS spectrum of RSAP I and RSAP II

Matrix: CCA; Laser instrument: N₂; Extractor: 9.3 kV; Repeller: 30 kV. The concentration of RSAP I and RSAP II was 1 g/L dissolved in double distilled water, then was mixed with CCA at a ratio of 1:1 (V/V), final concentration is 0.5 g/L.

RSAP I 和 RSAP II 的 SDS-PAGE 电泳分析结果也显示二者均为单一成分, 但是给出二者相对分子质量约 20×10^3 左右, 这是由于在电泳条件下多肽的异常行为所致^[13]. 相对分子质量小于 15 ku

的多肽在通常使用的 SDS 电泳条件下出现异常行为是因为 SDS-多肽胶束大致是一个球形, 而不是椭圆形, 它们的长度和直径在同一个数量级, 同时由于较高的多肽内部电荷不能被结合的 SDS 的电

荷所覆盖, 所以导致电泳测定的相对分子质量异常. 因此电泳分析结果不足以作为纯度鉴定标准, 而 MALDI-TOF-MS 则可以给出比较准确的相对分子质量和纯度信息.

2.2 氨基酸组成分析

本次实验没有测定半胱氨酸和色氨酸的含量, 其他氨基酸含量见表 1.

Table 1 Amino acid composition of RSAP I, RSAP II and Ax III

	RSAP I		RSAP II		Ax III
	n/nmol	Number	n/nmol	Number	Number
ASX	1.532	3.63	3.020	4.32	4
THR	0.384	0.91	0.670	0.96	2
SER	0.752	1.78	1.370	1.96	4
GLX	1.306	3.09	2.238	3.20	1
GLY	1.477	3.50	2.597	3.72	8
ALA	0.961	2.28	1.615	2.31	2
CYS	ND	/	ND	/	6
VAL	1.184	2.81	2.018	2.89	2
MET	/	/	0.315	0.45	0
ILE	0.422	1.00	0.699	1.00	2
LEU	0.398	0.94	0.673	0.96	4
TYR	0.294	0.70	0.664	0.95	0
PHE	0.812	1.92	1.747	3.93	0
LYS	0.713	1.69	1.256	1.80	2
HIS	0.578	1.37	1.083	0.55	2
TRP	ND	/	ND	/	3
ARG	0.472	1.12	0.877	1.25	1
PRO	0	0	0	0	4
M_r	5008		4992		4883

ND: not determined.

2.3 钠通道活性鉴定

将心肌细胞钳制在 -80 mV, 给予从 -80 至 -20 mV 的去极化, 脉冲时间为 50 ms, 引出一电压依赖性的内向电流, 此即为钠通道开放电流. 药物灌流后 1、3、5 min 时测定 I_{Na} , 研究药物对钠通道电流的影响. 实验数据以均数 $\bar{x} \pm s$ 差表示, 数据处理采用 paired-t 检验.

10^{-6} mol/L 浓度下, RSAP I 使 I_{Na} 由用药前的 (3.12 ± 0.21) nA 增大到 (3.97 ± 0.14) nA, I_{Na} 增加了 $27.74\% \pm 4.61\%$ ($0.005 < P < 0.01$, $n = 3$); RSAP II 使 I_{Na} 由用药前的 (3.27 ± 0.57) nA 减小到 (2.42 ± 0.52) nA, I_{Na} 减少了 $30.15\% \pm 9.22\%$ ($0.005 < P < 0.01$, $n = 4$). 实验结果见表 2.

通过对豚鼠心室细胞钠通道的实验, 初步结果

表明, 10^{-6} mol/L 浓度下海葵多肽 RSAP I 和 RSAP II 都对钠通道表现出活性, RSAP I 使钠电流增加, 表现为对钠通道的开放作用; RSAP II 使钠电流减少, 表现为对钠通道的阻滞作用.

Table 2 Effect of sea anemone toxin polypeptides RSAP II on inward Na^+ current in ventricular cells of guinea pigs

Sample	Cell number	$I_{Na}(\text{CTRL})$ / nA	I_{Na}^1 / nA	Paired-t Test	I_{Na} change / %
RSAP I	1	3.34	4.05	$0.005 < P < 0.01$	27.1
	2	2.70	3.69		
	3	3.32	4.16		
RSAP II	1	3.83	2.72	$0.005 < P < 0.01$	26.1
	2	1.65	0.88		
	3	3.38	2.88		
	4	4.23	3.20		

CTRL: control test, ¹⁾ 1 min after the drug was infused.

2.4 圆二色性测定

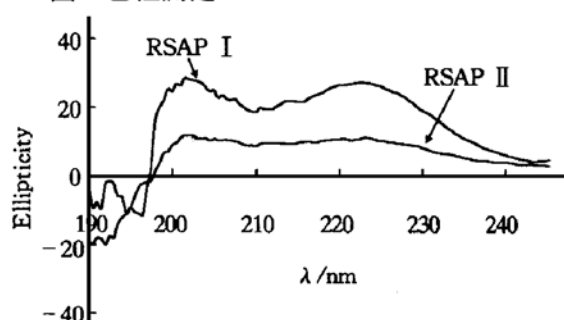


Fig. 4 CD spectrum of RSAP I and RSAP II

蛋白质在肽区域 (185~250 nm) 的 CD 谱与其二级结构具有直接关系. RSAP I 和 RSAP II 水溶液的圆二色谱在 201 nm 和 223 nm 处有两个近似等幅的正吸收带, 前者是酰胺发色团 $\pi-\pi^*$ 跃迁产生, 后者是 $n-\pi^*$ 跃迁产生. 采用 ch-2 模式进行计算, 计算结果表明 RSAP I 和 RSAP II 的圆二色谱与标准 β 转角非常相似, 都为 100% 的 β 转角.

在海葵毒素中高含量的 β 折叠和 β 转角结构是相当普遍的, 但是 RSAP I 和 RSAP II 的圆二色谱都表现为典型的 β 转角, 其二级结构非常相似, 但生物功能差异很大, 说明二者氨基酸序列应该具有很大的不同.

进一步的药理学实验, 氨基酸序列测定, 以及结构和功能关系研究正在进行之中.

参 考 文 献

- 1 Beress L. Biologically active compounds from coelenterates. *Pure Appl Chem*, 1982, **54** (10): 1984
- 2 Norton R S. Structure and structure-function relationships of sea anemone proteins that interact with the sodium channel. *Toxicon*, 1991, **29** (9): 1051~1084
- 3 Ho C L, Ko J L, Lue H M, *et al.* Effect of equinatoxin on the guinea pig atrium. *Toxicon*, 1987, **25** (5): 659~664
- 4 Norton R S, Bobek G, Ivanov J O, *et al.* Purification and characterisation of proteins with cardiac stimulatory and hemolytic activity from the sea anemone *Actinia tenebrosa*. *Toxicon*, 1990, **28** (1): 29~41
- 5 Galettis P, Norton R S. Biochemical and pharmacological studies of the mechanism of action of tenebrosin-C, a cardiac stimulatory and hemolytic protein from the sea anemone *Actinia tenebrosa*. *Toxicon*, 1990, **28** (6): 695~706
- 6 Schwartz H, Bidard J N, Frelin C. Purification, sequence and pharmacological properties of sea anemone toxins from *Radianthus panmotens*. a new class of sea anemone toxins acting on the sodium channel. *Biochemistry*, 1985, **24** (14): 3554
- 7 Kem W R. *The Biology of Nematocysts*, New York: Academic Press, 1988. 375~405
- 8 Cariello L, de Santis A, Fiore F, *et al.* Calitoxin, neurotoxic peptide from the sea anemone *Calliactis parasitica*: amino acid sequence and electrophysiological properties. *Biochemistry*, 1989, **28** (6): 2484~2489
- 9 Halstead B W. *Poisonous and Venomous Marine Animals of the World*. 2nd. Princeton: The Darwin Press, 1988. 99~186
- 10 Shiomi K, Qian W H, Lin X Y, *et al.* Novel polypeptide toxins with crab lethality from the sea anemone *Anemonia erythraea*. *Biochim Biophys Acta*, 1997, **1335** (1~2): 191~198
- 11 Gendeh G S, Young L C, de Medeiros C L C, *et al.* A new potassium channel toxin from the sea anemone *Heteractis magnifica*: isolation, cDNA cloning, and function expression. *Biochemistry*, 1997, **36** (38): 11461~11471
- 12 Ferlan I, Lebez D. Equinaoxin, a lethal protein from *Actinia equina* I, purification and characteriation. *Toxicon*, 1974, **12** (1): 57~61
- 13 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术. 北京: 科学出版社, 1999. 131

Guo Y J. Experimental technology of protein electrophoresis. Beijing: Scientific Press, 1999. 131

Isolation and Characterization of Toxin Polypeptides from Sea Anemone *Actinia cari*

ZHUO Ru-Peng¹⁾, FU Hong-Zheng¹⁾, ZHONG Chong-Bo²⁾,
WANG Xiao-Liang²⁾, LIN Wen-Han^{1)*}, ZHANG Li-He¹⁾,

¹⁾ State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Peking University, Beijing 100083, China;

²⁾ Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

Abstract Two toxin polypeptides (designated RSAP I and RSAP II) have been isolated from Sea anemone *Actinia cari*. Toxins isolation was accomplished by freezing-thawing extraction, acetone fractional precipitation, cation exchange chromatography on SP Sephadex C 25 and reverse phase HPLC on ODS C₁₈. They were found to be homogenous by SDS-PAGE and MALDI-TOF-MS, and their relative molecular masses are 5 008 and 4 992, respectively. They are found to be active on sodium channel in Guinea pig cardiac cell, RSAP I, increasing inward Na (+) currents, opens the sodium channel; RSAP II, decreasing inward Na (+) currents, inhibits the opening of the sodium channel. The circular dichroic spectra of these two polypeptides are 100% β turn.

Key words *Actinia cari*. sea anemone toxin. purification

* Corresponding author. Tel: 86-10-62062210, E-mail: whlin@mail.bjmu.edu.cn

Received: September 11, 2000 Accepted: November 3, 2000