

# 马氏钳蝎哺乳动物神经毒素 II 的部分氨基酸顺序

罗广祥\* 张丽青 顾梓伟 吉永华 徐科  
(中国科学院上海有机化学研究所) (中国科学院上海生理研究所)

## 提 要

用 DABITC-PITC 双偶合微量手工顺序方法和羧肽酶法, 测定了马氏钳蝎哺乳动物神经毒素 II 的 N-端和 C-端部分氨基酸排列顺序。N-端氨基酸顺序为: H-Val-Arg-Asp-Ala-Tyr-Ile-Ala-Asp-Pro-Asn-Asn-(Cys)-Val-Tyr-Glu-(Cys)-Ala-。C-端氨基酸顺序为: -Arg-Ile-Ser-Ile-OH。

多种蝎毒中含有选择性地作用于神经的神经毒素。目前已分离并测定了全部或部分氨基酸排列顺序的蝎毒素在三十种以上。其中有对哺乳动物作用较强的哺乳动物神经毒素和对昆虫作用较强的昆虫神经毒素。关于蝎的哺乳动物神经毒素作用机制的研究表明, 它们对可兴奋膜的钠或钾离子通道有着高度选择性作用。因而作为研究离子通道的工具越来越受到神经生物学家的重视<sup>[1,2]</sup>。

吉永华等从产于我国河南、山东的马氏钳蝎中分离到哺乳动物神经毒素 I 和毒素 II<sup>[3]</sup>, 并测定了毒素 I N-端部分氨基酸顺序<sup>[4]</sup>。宋文霞等也分离了马氏钳蝎神经毒素并进行了生物学研究<sup>[5,6]</sup>。至于蝎神经毒素 II, 由于它在蝎毒中含量低, 对它的结构研究遇到了困难。本文报告了马氏钳蝎哺乳动物神经毒素 II (缩写为 BmkII) 的部分氨基酸顺序测定结果。

## 材 料 与 方 法

毒蝎系采自我国河南与山东两省, 分类名称为 *Buthus martensi Karsch*。采毒及毒素分离纯化的方法见前文<sup>[5]</sup>。在进行顺序测定之前, 用 Sephadex G-50 柱(2.0×110 cm)层析, 对蝎毒素 II 进一步纯化。N-端顺序测定采用 DABITC (4-N, N-二甲胺基偶氮苯-4'-异硫氰

酸酯)-PITC (硫代异氰酸苯酯) 双偶合微量手工顺序测定方法, 按文献[7]进行。测定过程在充 N<sub>2</sub> 条件下进行, 所用的试剂药品均按测定顺序级的要求进行处理。C-端顺序测定工作采用羧肽酶 Y 酶解方法参照文献[8]进行。所用羧肽酶 Y 系 Sigma 公司产品, 酶解反应在 0.2mol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.2) 中, 25°C 下进行。酶与底物比为 1:100。酶解液用 20% 磺基水杨酸酸化终止酶解反应后, 用 LKB 4400 氨基酸分析仪进行定性定量测定。

## 结 果 与 讨 论

在进行顺序测定之前, 首先将分离到的粗蝎毒 BmkII 用 Sephadex G-50 柱层析方法进一步纯化。纯化后的蝎毒素 II 用 DABITC-PITC 双偶合微量手工顺序方法, 测定了 N-端 17 个氨基酸的排列顺序, 结果如图 1:

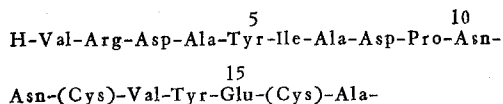


图 1 BmkII N-端部分氨基酸顺序

在测定中, 由于事先未对样品中的二硫键进行处理, 故无法确定样品中的半胱氨酸的位

\* 目前通讯地址: 上海细胞生物学研究所。

置。但 Rochat 等人<sup>[9]</sup>曾明确指出,所有蝎毒素都是由 4 个二硫键交连起来的低分子量蛋白,并且 8 个半胱氨酸都位于第 12、16、22、26、36、45(46)、47(48) 和 63 号位置上。Almassy 等人<sup>[10]</sup>的晶体 X 光衍射结果也证实了这一点。在我们的测定中,也恰好在测到第 12、16 号位置时呈现空白点。因而我们认为,在 BmkII 中的第 12、16 号位置上也应是半胱氨酸,这在图 1 中用括号指明。

BmkII 的 C-端顺序测定采用羧肽酶 Y 酶解方法。根据氨基酸酶解释放曲线(图 2)可以

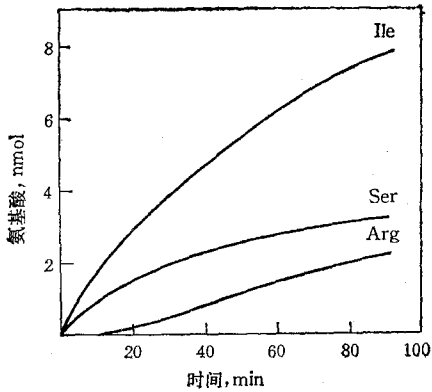
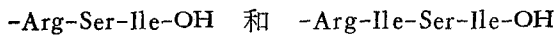


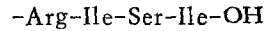
图 2 BmkII 羧肽酶 Y 酶解氨基酸释放曲线

看出,在酶解中最先释放的氨基酸是 Ile, 其次是 Ser 和 Arg。并且 Ile 的浓度比 Ser 和 Arg 的浓度高很多,因而 BmkII 的 C-端顺序存在两种可能性,即:



从酶解曲线来看,当 Ser 的释放已趋平衡后,Ile 的浓度仍在增加,并且在酶解 80min 后,Ile 的浓度约是 Ser 浓度的两倍,可以认为在 Ser 顺序之后还有一个 Ile 残基。所以后一个

顺序更符合酶解动力学。因此, BmkII 的 C-端顺序应为:



由于事先未对样品中的二硫键进行处理,故无法确定 C-端顺序中半胱氨酸的位置。

总括起来,我们得到 BmkII 的 N-端和 C-端部分氨基酸的排列顺序如图 3 所示:

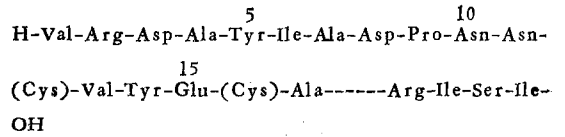


图 3 BmkII N-端和 C-端部分氨基酸排列顺序

BmkII N-端顺序与徐科等人<sup>[4]</sup>测定的 BmkI N-端顺序相比,除了第 8 位残基在 BmkI 中不确定而在 BmkII 中为 Asp 外,其余 16 个氨基酸顺序均相同。因此,我们认为 BmkII 与 BmkI 一样同属于由 Rochat 等人<sup>[8]</sup>分类的 C 组蝎毒。

### 参 考 文 献

- [1] 周新华:《生物化学与生物物理进展》,1984,(2),20。
- [2] 宋文霞等:《生物化学杂志》,1987,3(2),105。
- [3] 吉永华等:《生物化学与生物物理学报》1983,15(6),517。
- [4] 徐科等:《科学通报》,1984,29,1200。
- [5] 王锦兰等:《生物化学杂志》,1985,1(3),29。
- [6] 宋文霞等:《生物化学与生物物理学报》,1987,3(19),201。
- [7] 上海有机化学研究所天花粉蛋白研究组:《有机化学》,1982,5,384。
- [8] Hayashi, R.: *Methods in Enzymol.*, 1976, XLV, 568。
- [9] Rochat, H., et al: *Adv. Cytopharmacol.*, 1979, 3, 325。
- [10] Almassy, R. J., et al: *J. Mol. Biol.*, 1983, 170(2), 497。

[本文于 1987 年 12 月 28 日收到]