

虎纹捕鸟蛛毒素 V 的二硫键定位分析*

张鹏飞^{1,2)} 肖顺勇²⁾ 梁宋平²⁾**

(¹⁾中南大学湘雅医院卫生部肿瘤蛋白质组学重点实验室, 长沙 410008;

²⁾湖南师范大学生命科学学院, 蛋白质组学与发育生物学省部共建国家重点实验室, 长沙 410081)

摘要 虎纹捕鸟蛛毒素 V 是从虎纹捕鸟蛛毒液中分离得到的一种昆虫毒素. 它含有 35 个氨基酸残基, 其中 6 个半胱氨酸形成三对二硫键. 首先采用多酶将天然的肽链裂解后, 通过 MALDI-TOF 质谱分析酶解肽段, 推断出 1 对二硫键位于 Cys9-Cys21, 然后利用改进的部分还原分步测序法, 确定虎纹捕鸟蛛毒素 V 的另外 2 对二硫键的配对方式为 Cys2-Cys16 和 Cys15-Cys28. 因此, 虎纹捕鸟蛛毒素 V 的 3 对二硫键分别以 Cys2-Cys16, Cys9-Cys21, Cys15-Cys28 (即 1-4、2-5 和 3-6) 的方式配对.

关键词 虎纹捕鸟蛛毒素 V, 二硫键定位, 三羧甲基磷酸 (TCEP)

学科分类号 O6, Q5

虎纹捕鸟蛛毒素 V (Huwentoxin-V, HWTX-V) 是从虎纹捕鸟蛛粗毒中分离得到的一种多肽神经毒素, 它含 35 个氨基酸, 其中 6 个半胱氨酸形成了 3 对二硫键. HWTX-V 的分子质量是 4 111.5 u, 其氨基酸序列为: NH₂-ECRWYLGCSQDGDCKHL-QCHSNYEWCVWDGTFSS-COOH. HWTX-V 能可逆地麻痹蝗虫和蜚蠊数小时, 对蝗虫的半有效剂量是 (16 ± 5) μg, 大剂量毒素可使昆虫致死^[1]. 梁宋平等已经从虎纹捕鸟蛛毒液中分离出多种毒素, 并对它们分别进行了二硫键定位和其他方面的深入研究, 其中 HWTX-I^[2]、HWTX-IV^[3,4] 和 SHL-I^[5] 都是以 1-4, 2-5, 3-6 的二硫键连接方式存在, 而 HWTX-II^[6] 却以 1-3, 2-5, 4-6 一种特殊的二硫键配对方式存在. 至今已从蜘蛛粗毒中分离出大量的神经肽类毒素, 虽然这些毒素在一级结构和生物学活性方面互不相同, 但是较多的在空间结构上采用抑制剂胱氨酸结模体 (inhibitor cystine knot motif, ICK) 和相同的二硫键配对方式 (即 1-4, 2-5, 3-6). 进一步的研究表明二硫键在维系蛋白质的三级结构上有很重要的作用, 对于这类蜘蛛多肽, 其核心结构在很大程度上取决于二硫键的连接模式^[7]. 同源性比较发现 HWTX-V 与 ProTx-I (64%), SGTx-I (57%), SNX-482 (55%), HaTx1/HaTx2 (54%) 等毒素有较高的同源性, 它们都含 6 个半胱氨酸, 其中有 2 个为相邻半胱氨酸, 而且它们的半胱氨酸位置高度保守^[1].

目前二硫键定位的方法主要有: 对角线法、肽链裂解及含二硫键肽段的分离与鉴定、解析空间结构确定二硫键位置、二硫键异构分析及二硫键突变分析、直接测序法、部分还原测序法以及氰化半胱

氨酸裂解法等^[8-11]. 它们各具特点, 也各有局限. 多步酶切或化学降解是最常用的蛋白质二硫键定位方法, 它利用多种酶或化学试剂裂解蛋白质 Cys 之间的肽链连接, 分离得到只含一对二硫键的肽段, 通过质谱仪测定裂解混合物的肽质量指纹谱图间接推断蛋白质的二硫键形式, 或在 HPLC 分离后通过 Edman 降解测定分离肽段的氨基酸序列进行二硫键定位. 蛋白质具有一定的空间结构, 二硫键在蛋白质中的分布互不相同, 二硫键的构象能量 (conformational energy) 和与还原剂的接近程度也互不相同, 即不同二硫键的还原动力学各不相同, 因而蛋白质可以在还原剂作用下被选择性地还原, 水溶性的 TCEP 是一种极为合适的部分还原试剂. 本文报道采用多酶将天然的 HWTX-V 肽链裂解后, 通过 MALDI-TOF 质谱分析出只含有一对二硫键的肽片段, 初步推断一对二硫键配对方式, 同时 HWTX-V 在 TCEP 的作用下被选择性地还原, RP-HPLC 分离反应混合物, 收集其还原中间体, 使之马上与碘乙酰胺反应, 烷基化游离巯基 (-SH) 后测定其氨基酸序列, 确定其另外 2 对二硫键的配对方式, 全部 3 对二硫键的位置得以准确确定. 这一结果为 HWTX-V 的 2D-NMR 技术解析其溶液构象奠定了基础, 也可为含有相邻半胱氨酸的多肽分子的二硫键定位提供方法学参考.

* 国家自然科学基金重大项目资助 (39990600).

** 通讯联系人.

Tel: 0731-8872556, Fax: 86-731-8861304

E-mail: liangsp@public.cs.hn.cn

收稿日期: 2003-12-12, 接受日期: 2004-02-25

1 材料和方法

1.1 材料

所有测序试剂均来自 Applied Biosystem 公司; 胰蛋白酶、谷氨酸酶、碘乙酰胺 (IAA)、三氟乙酸 (TFA)、三羧甲基磷酸 (TCEP)、碘乙酰胺和 α -氰基-4-羟基肉桂酸 (CCA) 购于美国 Sigma 公司; 乙腈 (CAN) 色谱纯试剂购于湖南海利化工研究所; 其他试剂都为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 酶解: 200 μg 天然的 HWTX-V 溶于 200 μl 磷酸 (pH 7.8) 缓冲液中. 加入胰蛋白酶和谷氨酸酶各 4 μg , 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下温育, 定期取样, 用 MALDI-TOF 质谱仪监视水解进程。

1.2.2 质谱分析: 采用 Voyager-DETM STR BiospectrometryTM workstation (Applied Biosystem) 测定各样品的分子质量, 线性阳离子工作反射模式; N_2 激光源波长 337 nm; 离子加速电压 20 000 V. 基质为 α -氰基-4-羟基肉桂酸 (CCA), 按以下方式准备测定样品, 取 2 μl 样品液加入到 20 μl 以 0.1% TFA-50% 乙腈配制的 (CCA) 饱和溶液, 混匀后取 1 μl 点样, 室温干燥后放入质谱仪里进行测定. 所有质谱分析采用 HWTX-I^[2] (分子质量为 3 750.45) 作为外标进行校正。

1.2.3 部分还原: 200 μg 天然 HWTX-V 溶于 60 μl 的 6 mol/L 盐酸胍 (pH = 3.0) 溶液中, 变性 30 min 后, 加入 20 μl 的 TCEP 柠檬酸溶液 (TCEP 用 0.1 mol/L, pH 为 3 的柠檬酸溶液配制成 0.1 mol/L 贮液, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min, 加入 0.1% TFA- H_2O 稀释至 200 μl , 用 RP-HPLC 进行分离 (柱: Vydac C₁₈ 2.1 mm \times 250 mm, 温度: 40 $^{\circ}\text{C}$; 流动相: A, 0.1% TFA- H_2O ; B, 0.1% TFA-ACN, 梯度 0 ~ 60 min, 25% ~ 40% B), 收集各色谱峰, 冷冻干燥。

1.2.4 部分还原的虎纹毒素 V 巯基的快速烷基化修饰及分子质量测定: 所需组分经冷冻干燥后分别与 100 μl 含 0.5 mol/L 碘乙酰胺溶液 (溶于 0.5 mol/L N-甲基吗啉溶液, pH = 8.3) 反应 1.5 min, 加入 100 μl 0.1% TFA- H_2O 终止反应, RP-HPLC 脱盐分离 (反相柱和分离条件同前). 收集色谱峰, 经质谱鉴定进一步确定游离的巯基化数目, 冷冻浓缩至 50 μl 用于测序分析。

1.2.5 氨基酸序列分析: 氨基酸序列分析在 491-气相测序仪上完成, 每个样品测 29 个循环, 采用

仪器配备的标准程序, 在线 HPLC 检测, 并通过测定 PTH-CM-Cys 出峰的信号以确定二硫键的配对方式。

2 结果和讨论

2.1 天然 HWTX-V 的酶解

为了得到只含一对二硫键的肽片段, 采用了两种酶 (胰蛋白酶/trypsin 和谷氨酸酶/V8) 混合同步酶解, 酶解片段用 Voyager-DE STR MALDI-TOF 质谱进行分析. 表 1 为部分肽段的质谱结果. 根据 HWTX-V 的氨基酸序列结合 trypsin/V8 酶切位点和理论分子质量, 可以推测出各酶解片段的氨基酸序列. 将用质谱仪实测的酶解片段分子质量与理论分子质量相比, 得到 2 个只含有一对二硫键的片段, 而这 2 个酶解片段中都有 Cys9 和 Cys21, 从而推断出天然 HWTX-V 中 Cys9-Cys21 可能形成一对二硫键。

Table 1 MALDI-TOF MS analysis of the peptides by multi-enzymatic digestion of native HWTX-V

Partial sequence*	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺
	theoretical	measured
18~26	1 130.20	1 130.67
(4~12)-S-S-(18~25) ¹⁾	2 027.19	2 027.14
(5~12)-S-S-(18~27) ¹⁾	2 156.30	2 156.76
(2~5)-S-S-(15~19)-S-S-(25~34) ²⁾	2 660.05	2 660.50
(2~17)-S-S-(20~34) ³⁾ └── S-S ──┘	3 774.11	3 774.48

* Numbers denote amino acid position as found in the sequence of the native HWTX-V. ¹⁾ One intra-chain disulfide bond present in the one chain of the fragment. ²⁾ Two intra-chain disulfide bonds present in the one chain of the fragment. ³⁾ Three intra-chain disulfide bonds present in the one chain of the fragment.

2.2 天然 HWTX-V 的部分还原

HWTX-V 中含有两个相邻的半胱氨酸残基, 并且都参与形成二硫键, 因此通过在酶解肽段并分离鉴定含二硫键的方法, 得不到这两个半胱氨酸形成二硫键的信息. Gray^[10] 于 1993 年提出了一种解决富含二硫键多肽的二硫键定位的方法. 他采用 TCEP 在酸性环境下对多肽进行部分还原, 分离部分还原的异构体, 将游离的巯基烷基化, 通过序列分析鉴定被标记的 Cys 残基, 得到二硫键的位置

信息。我们通过摸索找出适宜的条件，使用改进的部分还原测序方法得到了很好的结果。HWTX-V 各种部分还原的中间体都有比较高的信号，分离到 12 个峰，用 MALDI-TOF 质谱仪测定它们的分子质量，通过与 HWTX-V 的理论分子质量进行比较可确定：其中峰 3 有一对二硫键被还原，峰 8 有两对二硫键被还原，而峰 5 为没有被还原的天然 HWTX-V，峰 9 为完全被还原的多肽。也就是说峰 3 和 8 组分是 HWTX-V 被部分还原的中间体，分别含有 2 个和 4 个游离的 —SH，将游离的巯基加以烷基化修饰，并在分析二者的氨基酸序列就可以确定 HWTX-V 的二硫键位置。在图 1 中：(a) 为部分还原天然 HWTX-V 的反相 HPLC 结果；(b) 为 (a) 图中峰 3 组分经碘乙酰胺修饰后的质谱图；(c) 为 (a) 图中峰 8 组分经碘乙酰胺修饰后的质谱图。根据这两个还原中间体经碘乙酰胺修饰后的分子质量，我们可以确定峰 3 组分为一对二硫键被还原中间体，峰 8 成分为二对二硫键被还原中间体。

2.3 部分还原中间体的烷基化修饰

峰 3、8 分别与碘乙酰胺在碱性环境中反应，其产物通过 RP-HPLC 进行分离，收集洗脱峰进行 MALDI-TOF MS 分析，峰 3 烷基化修饰后得分子质量为 4228.3 (图 1b)，峰 8 烷基化修饰后得分子质

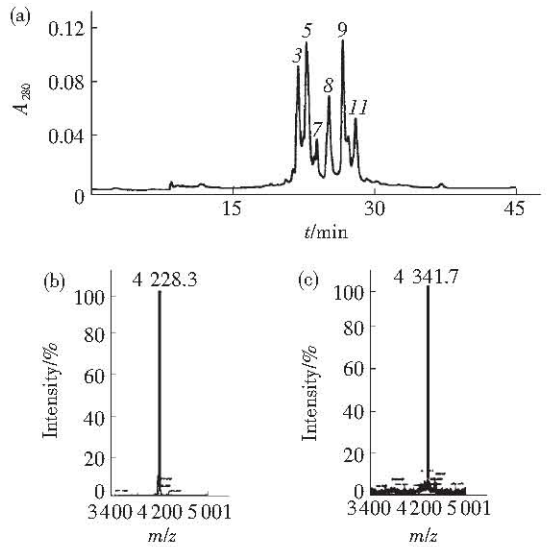


Fig. 1 RP-HPLC chromatogram of the partially reduced products of HWTX-V (a) and MALDI-TOF chromatogram of two partial reduced products after carboxamidomethylation (b, c)

(a) RP-HPLC chromatogram of the partially reduced products of HWTX-V. Partial reducing conditions were described in the text. Resulting peptides were separated on a Vdyac C₁₈ column at rate of 0.7 ml/min with a linear gradient 25% ~40% Bin 60 min. The peaks labeled with 3 and 8 are products of partial reduction. (b) MALDI-TOF MS analysis of fraction 3 in (a). It indicated one thiod was carboxamidomethylated. (c) MALDI-TOF MS analysis of fraction 8 in (a). It also indicated two thiods were carboxamidomethylated.

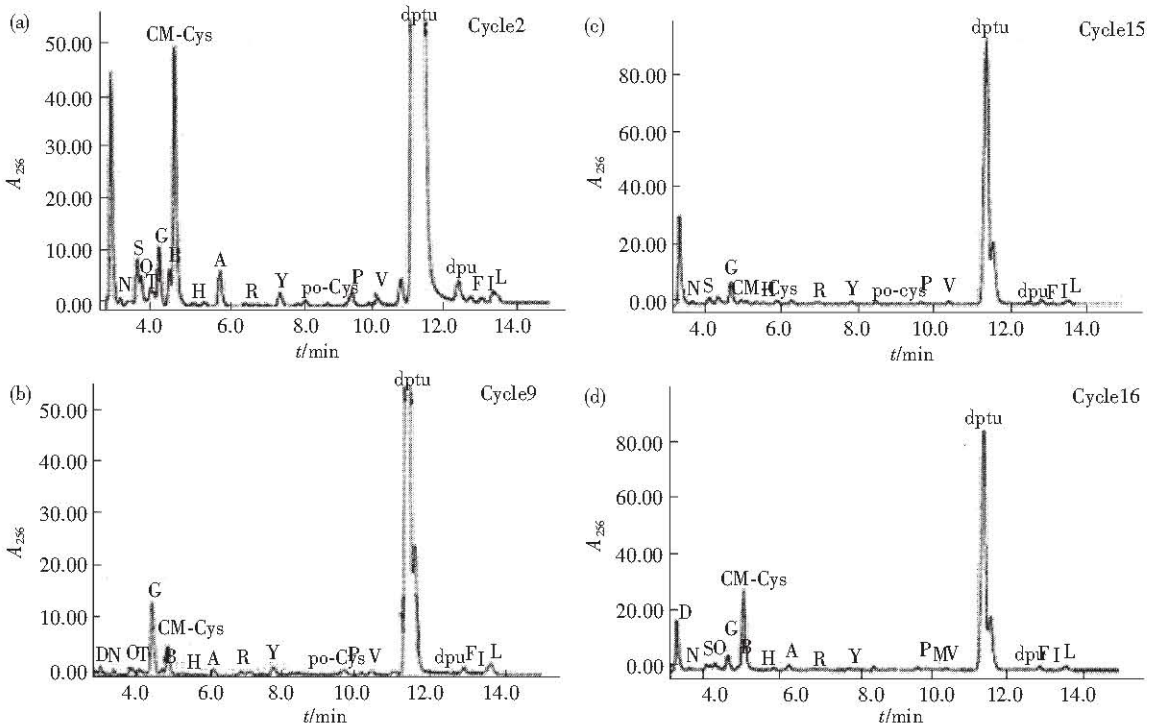


Fig. 2 The chromatograms of phenylthiohydanyons of Edman degradation observed at cycles 2 (a), 9 (b), 15 (c), 16 (d) of the one thiod reduced and carboxamidomethylated HWTX-V

量为4341.7 (图1c), 经过计算可以进一步确定峰3与8组分分别为HWTX-V的一对二硫键和两对二硫键被还原的多肽分子。

2.4 一对二硫键被还原组分的测序结果

收集峰3组分烷基化修饰后, 经RP-HPLC脱盐, 收集修饰成分在冷冻干燥机中浓缩至50 μ l, 将其全部加入到491型gas-liquid-phase sequencer反应室中进行序列分析。天然的HWTX-V其二硫键形式存在的半胱氨酸由于 β -消除等副反应, 在序列分析中没有PTH-CM-Cys信号, 而烷基化修饰的半胱氨酸在序列分析中较为稳定。从烷基化修饰后峰3测序结果可知(图2): 在半胱氨酸所在的第2和第16循环时出现了很强的PTH-CM-Cys信号, 而在第9, 15, 和21循环中没有信号, 这一

结果表明, 峰3中被TCEP还原的一对二硫键为Cys2和Cys16, 到第23个循环就停止了测序分析。由此可以确定的一对二硫键是Cys2-Cys16连接而成, 而Cys9, Cys15, Cys21和Cys28则分别以另外的二硫键的形式存在。

2.5 二对二硫键被还原组分的测序结果

从收集峰8修饰后的测序图可知(图3): 在第2, 15, 16和28循环有较高的PTH-CM-Cys信号, 而在第9和21循环中只有很低的PTH-CM-Cys信号, 可以认为峰8成分是在Cys2-Cys16被还原的基础上, Cys15和Cys28形成的二硫键进一步被TCEP所还原, Cys15和Cys28在天然HWTX-V中以二硫键的形式存在即Cys15-Cys28。而Cys9和Cys21仍以二硫键的形式存在(没有被还原), 它

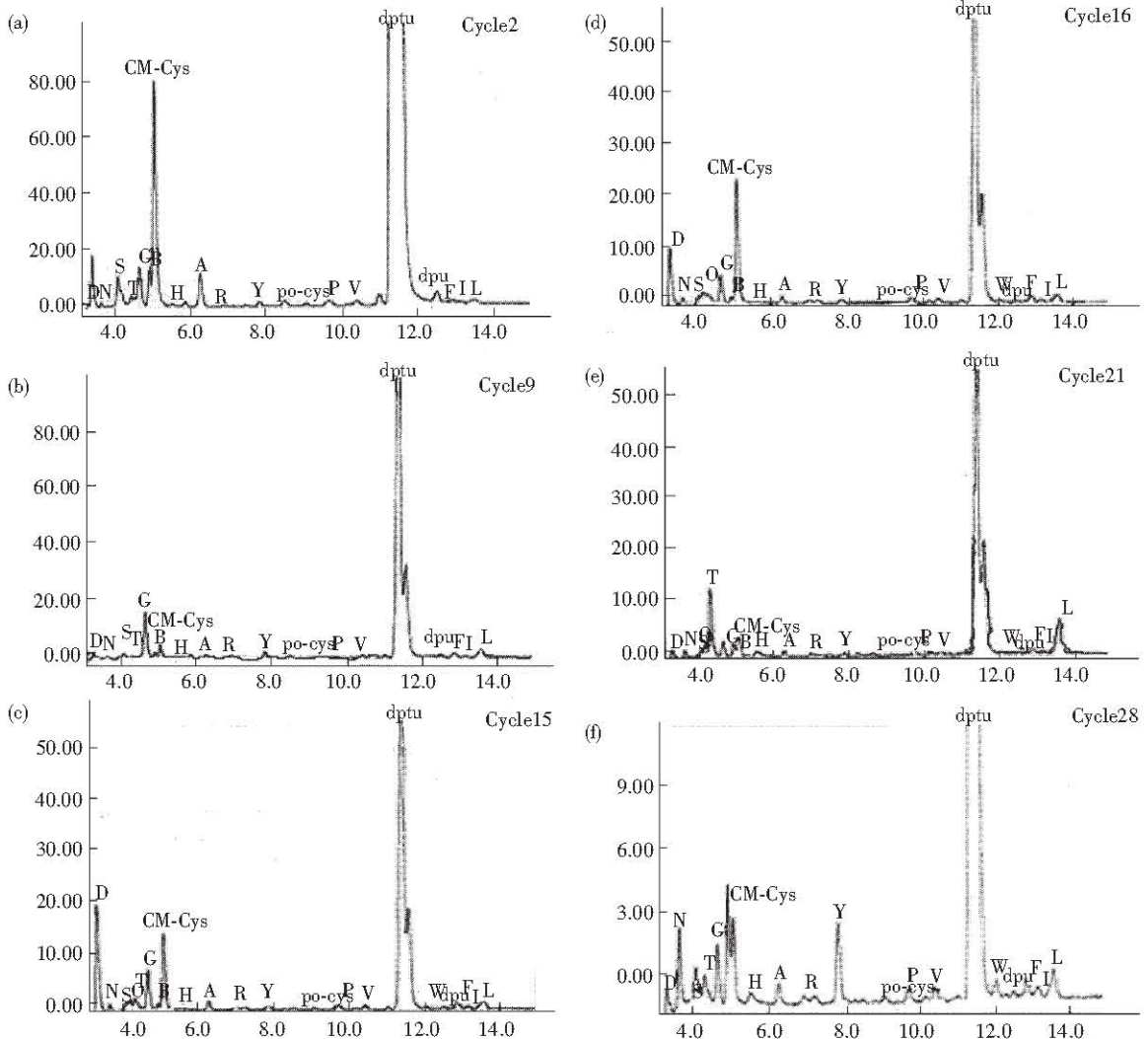


Fig. 3 The chromatogram of phenylthiohyantzions of Edman degradation observed at cycle 2 (a), 9 (b), 15 (c), 16 (d), 21 (e), 28 (f) of the two thio reduced and carboxamidomethylated HWTX-V

们在测序循环中出现很小的 PTH-CM-Cys 信号主要有两个方面的原因: 其一在反相 HPLC 峰中带有小部分 3 对二硫键都被还原的成分. 其二, TCEP 在酸性环境中可能也有部分二硫键交换反应的发生.

根据上述实验结果, HWTX-V 3 对二硫键的配对情况为: Cys2-Cys16, Cys9-Cys21 和 Cys15-Cys28. 与 HWTX-V 具有较高同源性的 ProTx-1, SGTx-1, SNX-482 以及 HaTx1/HaTx2 都是以 1-4、2-5、3-6 的二硫键配对方式连接其中的 6 个半胱氨酸. 根据它们的同源性和二硫键配对方式, 推断 HWTX-V 很可能属于抑制剂胱氨酸结这种广泛存在的结构模体.

在二硫键定位中, 一般使用肽链裂解后并分析含二硫键肽段的方法, 即采用各种方法将蛋白质或多肽在 Cys 残基之间断裂, 分离得到只含一对二硫键的肽段, 通过质谱或测序等方法确定二硫键的位置. 裂解肽链的方法常用特异性较强的酶解或化学裂解, 便于进行产物分析. HWTX-V 用高特异性的酶, 如胰蛋白酶无法得到只含有一对二硫键的片段, 同时酶切是在碱性环境下进行, 长时间置于碱性环境会加速二硫键的交换反应. 使用两种酶(胰蛋白酶和谷氨酰胺酶)混合, 可以确保 Cys 残基之间裂解, 加速裂解的速率. 在 pH 7.8 酶解 16 h 能得到比较好的结果, 但是由于裂解的片段较多, 各片段在反相 HPLC 上的色谱行为相差很小, 没能分离得到单个的片段.

从热力学的角度分析, 在利用 TCEP 对其进行还原时理论上可以得到 6 种部分还原中间体, 其中 3 种为含有 1 对二硫键被还原, 3 种含有 2 对二硫键被还原. 本实验我们得到了全部 6 种还原中间体, 但是它们的量各不相同, 说明 HWTX-V 的 3 对二硫键在动力学稳定性上存在差别. 二硫键 1-4 应该是处于结构的外部, 最容易与还原剂接近, 最容易被还原, 而二硫键 2-5 和 3-6 可能处于整个分子的核心, 对稳定分子的空间结构起到很重要的作用. HWTX-V 的结构还有待进一步用 NMR 解析的方法进行研究.

部分还原和分步测序确定二硫键配对方式的方法结果可靠、直观, 对富含二硫键并且含有相邻半胱氨酸的多肽具有一定的普遍性. 但是即便是同一类的多肽, 它们的空间结构也各不相同, 在选择用 TCEP 进行还原时需要摸索反应条件^[4]. 用 TCEP

还原主要的条件有: a. 是否需要先介入一定量的盐酸胍使蛋白质处于部分变性的状态; b. TCEP 与被还原的蛋白质的量之比; c. 反应的时间 (t) 和温度 (T) 等. 加入盐酸胍可使蛋白质紧密的结构变得松散, 二硫键较容易与 TCEP 接触而被还原, 同时也缩小不同二硫键之间的差别, 可以使实验得到较多的还原中间体. 适当过量的 TCEP 能保证蛋白质还原较快地进行, 但是 TCEP 量过大会使不稳定的还原中间体过快还原成完全变性的蛋白质. 本实验中, 先用盐酸胍使 HWTX-V 变性 30 min, 在 37°C 与含 10 倍半胱氨酸的 TCEP 反应 12 ~ 15 min, 便可得到较多的还原中间体, 便于二硫键定位分析.

致谢 感谢湖南师范大学生命科学学院蛋白质化学研究室胡卫军老师帮助完成氨基酸测序工作.

参 考 文 献

- 1 Zhang P F, Chen P, Liang S P, *et al.* Huwentoxin-V, a novel insecticidal peptide toxin from the spider *Selenocosmia huwena*, and a natural mutant of the toxin: indicates the key amino acid residues related to the biological activity. *Toxicon*, 2003, **42** (1): 15 ~ 20
- 2 Zhang D Y, Liang S P. Assignment of the disulfide bridges of huwentoxin-I, a neurotoxin from the spider *Selenocosmia huwena*. *J Protein Chem*, 1993, **12** (6): 735 ~ 740
- 3 Peng K, Shu Q, Liang S P, *et al.* Function and solution structure of huwentoxin-V, a potent neuronal TTX-sensitive sodium channel antagonist from Chinese bird spider *Selenocosmia huwena*. *J Biol Chem*, 2002, **277** (49): 47564 ~ 47571
- 4 刘中华, 梁宋平. 部分还原和分步序列测定法定位虎纹捕鸟蛛毒素-IV 二硫键. *中国高等学校化学学报*, 2003, **24** (10): 1815 ~ 1819
- 5 Li F, Liang S P. Assignment of three disulfide bonds of *Selenocosmia huwena* lectin-I from the venom of spider *Selenocosmia huwena*. *Peptides*, 1999, **20** (9): 1027 ~ 1034
- 6 Shu Q, Huang R H, Liang S P. Assignment of the disulfide bonds of huwentoxin-II by Edman degradation sequencing and stepwise thiol modification. *Eur J Biochem*, 2001, **268** (8): 2301 ~ 2307
- 7 Norton R S, Pallaghy P K. The cystine knot structure of ion channel toxins and related polypeptides. *Toxicon*, 1998, **36** (11): 1573 ~ 1583
- 8 Smith D L, Zhou Z. Strategies for locating disulfide bonds in proteins. *Methods Enzymol*, 1990, **193**: 374 ~ 389
- 9 Wu J, Gage D A, Watson J T. A strategy to locate cysteine residues of protein by specific chemical cleavage followed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Analytic Biochemistry*, 1996, **235** (2): 161 ~ 174
- 10 Gray W R. Disulfide structure of highly bridged peptides, a new strategy for analysis. *Protein Science*, 1993, **2** (10): 1732 ~ 1748
- 11 Cosena L, Sweeney E, Murphy J R. Disulfide bond assignment in human interleukin-7 by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectroscopy and sire-directional cysteine to serine mutational analysis. *J Biol Chem*, 1997, **272** (52): 32995 ~ 33000

Assignment of The Disulfide Bonds of Huwentoxin-V From The Venom of Chinese Bird Spider *Selenocosmia huwena* *

ZHANG Peng-Fei^{1, 2)}, XIAO Shun-Yong²⁾, LIANG Song-Ping²⁾ **

¹⁾ Key Laboratory of Cancer Proteomics of Chinese Ministry of Health, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China;

²⁾ State Key Laboratory of Proteomics and Developmental Biology, College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract Huwentoxin-V (HWTX-V) is an insecticidal peptide purified from the venom of spider *Selenocosmia huwena*. HWTX-V contains 35 amino acid residues, including six cystein residues that form three pairs of disulfide bond. The positions of the disulfide bonds of HWTX-V have been determined. To map the disulfide bonds, native HWTX-V was multi-proteolytically digested. The resulting peptides were identified by matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, and it indicated the presence of one disulfide bond Cys9-Cys21. The partially reduced peptides by using Tris-(2-carboxyethyl)-phosphine at pH 3.0 over 12 minutes were purified by reverse phase high-performance liquid chromatography, and then one -free thiod and two-free thiod fractions were collected. The free thiods were carboxamidomethylate by iodoacetamide at the concentration of 0.5mol/L. The locations of disulfide bond Cys2-Cys16 and Cys15-Cys28 were proved by comparing N-terminal sequencing analysis these partially reduced and alkylated HWTX-V with that of the intact peptide. Finally, the three disulfide linkage of HWTX-V could be assigned as Cys2-Cys16, Cys9-Cys21 and Cys15-Cys28.

Key words Huwentoxin-V, assignment of disulfide bond, Tris-(2-carboxyethyl)-phosphine (TCEP)

* This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (39990600).

** Corresponding author. Tel: 86-731-8872556, Fax: 86-731-8861304, E-mail: liangsp@public.cs.hn.cn

Received: December 12, 2003 Accepted: February 25, 2004