

研究报告

β -Agkistrodotoxin 的聚合与异构体观察*

任惠民 吉永华

(中国科学院上海生理研究所, 上海 200031)

摘要 中国江浙产短尾蝮蛇突触前神经毒素 (β_1 -Agkistrodotoxin, β_1 -AgTx) 经制备电泳被进一步纯化. 经 SDS-PAGE 鉴定, 观察到天然 β_1 -AgTx 以及经电泳纯化获得的碱溶 β_1 -AgTx-OH⁻ 成分在电泳图谱上出现的聚合谱带, 然而这些聚合谱带的含量似乎并不随时程的延长而明显地增强. 另经双向电泳分析发现, 无论是天然的 β_1 -AgTx 或经电泳纯化获得的碱溶 β_1 -AgTx-OH⁻ 成分均含有三个具有不同等电点 (pI 7.0, 5.8 和 5.4) 及不同含量比例的异构体谱带. 天然 β_1 -AgTx 中三个异构体的含量比并不随时程延长而明显改变, 碱溶 β_1 -AgTx-OH⁻ 成分中的三个异构体的含量比则随时程的延长而发生显著的变化.

关键词 中国江浙产短尾蝮蛇突触前神经毒素 (β_1 -AgTx), β_1 -AgTx-OH⁻, 聚合, 异构体

过去的研究已表明我国江浙产日本短尾蝮蛇 (*Agkistrodon blomhoffii brevicaudus*) 蛇毒中的主要致死因子应是一类属神经毒素的蛋白成分^[1]. 最近从该蛇毒中, 已分离纯化并鉴定了两个均属作用于神经突触前并被分别命名为 β_1 -AgTx (β_1 -Agkistrodotoxin) 和 β_2 -AgTx (β_2 -Agkistrodotoxin) 的神经毒素成分^[2]. 这两个毒素成分均由 122 个氨基酸残基组成, 等电点亦均呈中性特征, 并都具有相对较弱的磷酸酯酶 A₂ 的酶活性. 经生物毒性鉴定, β_1 -AgTx 比 β_2 -AgTx 的生物毒性约强 7 倍. 有趣的是, 当比较两者间的序列结构时, 发现两者间仅存着 2 个残基的天然变异 (Val55 → Pro, Asn80 → Trp)^[3]. 然而, 该类毒素蛋白在自然生理状态下, 究竟是以单体形式存在还是以多聚体的形式存在至今仍是一个有待验明的疑题. 本研究在过去工作的基础上, 用制备电泳的方法, 对其中 β_1 -AgTx 神经毒素成分进行了进一步纯化, 观察到了该类毒素蛋白在中性偏碱条件下, 有易产生聚合以及随时程变化易出现异构体的现象.

1 材料与方法

1.1 β_1 -AgTx 的柱层析分离及 HPLC 纯化

短尾蝮蛇 (*Agkistrodon blomhoffii brevicaudus*) 粗毒直接采自于我国江苏省常熟市一个体蛇养殖场. 参照吉永华等^[2]的方法, 将粗毒溶于 10% 醋酸溶液后, 分别经 Sephadex G-25 和 G-50 柱层析, 再经 HPLC, 最后经 CM-Sephadex C50 离子交换柱层析等步骤分离纯化, 获得粗毒中的 β_1 -AgTx 组分.

1.2 β_1 -AgTx 的进一步纯化

5 mg 的 β_1 -AgTx 干粉溶于 600 μ l 的 0.05 mol/L Tris-0.38 mol/L Gly 缓冲溶液 (pH 8.3), 按任惠民等^[4]方法对 β_1 -AgTx 进行电泳分离. 凝胶浓度为 0.1% SDS-12.5% 聚丙烯酰胺 (100 mm × 80 mm × 0.7 mm), 电泳缓冲液为含 0.01% SDS 的 0.025 mol/L Tris-0.19 mol/L Gly, pH 8.3. 每块凝胶加样量约

* 国家自然科学基金 (39570235) 和上海科学技术发展基金 (95XD14002) 资助.
收稿日期: 1996-10-03, 修回日期: 1997-01-17

1 mg. 电泳结束后凝胶按 Fernander-Patron 等^[5]报道的咪唑-ZnSO₄ 法进行染色. 在黑色背景下将含有所要的 β_1 -AgTx 凝胶小心切下, 然后在自制的蛋白质回收装置上进行电洗脱, 电洗脱缓冲液为含 0.005% SDS 的 0.025 mol/L Tris-0.19 mol/L Gly, pH 8.3. 回收的蛋白质溶液置入透析袋, 4℃条件下对 H₂O 透析过夜, 然后再对 pH 4.0 的醋酸溶液透析 24 h. 倾出透析袋内溶液, 1 000 g 离心 15 min, 吸取上清液并冷冻干燥, 得少量的称之为酸溶的 β_1 -AgTx 并记为 β_1 -AgTx-H⁺. 离心后所得的沉淀用 pH 7.5 的 NH₄OH 溶解, 装入透析袋后对同样的 NH₄OH 溶液透析 1 h, 然后 1 000 g 离心 15 min, 上清液冷冻干燥, 得大量的称之为碱溶的 β_1 -AgTx 并记为 β_1 -AgTx-OH⁻.

1.3 电泳纯化的 β_1 -AgTx 成分纯度鉴定

取少量酸溶的 β_1 -AgTx (β_1 -AgTx-H⁺) 用水或 pH 4.0 的醋酸溶液溶解, 碱溶的 β_1 -AgTx (β_1 -AgTx-OH⁻) 则先以少量 H₂O 混匀, 搅拌中缓慢加入 0.05 mol/L NaOH 溶液直至样品全部被溶解 (pH 约为 7.5). 参照 Leammli 描述的方法^[6]对上述两个样品进行 SDS-PAGE 分析, 用考马斯亮蓝 R-250 染色后,

对电泳图谱进行扫描并估算它们各自的纯度.

1.4 不同 β_1 -AgTx 成分的稳定性观察

取 β_1 -AgTx 成分分别溶于 pH 7.5 的 NaOH 及 pH 4.0 的醋酸溶液, β_1 -AgTx-H⁺ 成分和 β_1 -AgTx-OH⁻ 成分的溶解则分别与上述 1.3 提及的溶液相同. 溶解后的所有样品均在 4℃条件下保存, 取不同的时程对样品进行分析. 单向电泳参照 Leammli 方法^[6], 双向电泳则参照 O' Farrell 方法^[7]进行.

2 结 果

2.1 不同方法纯化的 β_1 -AgTx 纯度鉴定

经柱层析分离及 HPLC 纯化获得的 β_1 -AgTx 样品, 无论是以 pH 7.5 的 NaOH 溶液溶解还是以 pH 4.0 的醋酸溶液溶解, 在电泳图谱上均显示除了一个约占 > 95% 含量, 分子质量约 15 ku 的谱带外, 还显示有总量约占 < 5% 的三条浅带 (图 1a). 而经电泳进一步分离纯化和透析所获得的 β_1 -AgTx-H⁺ 成分和 β_1 -AgTx-OH⁻ 成分在电泳图谱上均呈现出清晰且单一的, 分子质量约为 15 ku 的谱带 (图 1b), 两者纯度均达到 98% 以上.

2.2 不同 β_1 -AgTx 成分的聚合现象

经 SDS-PAGE 鉴定 4℃条件下存放不同时

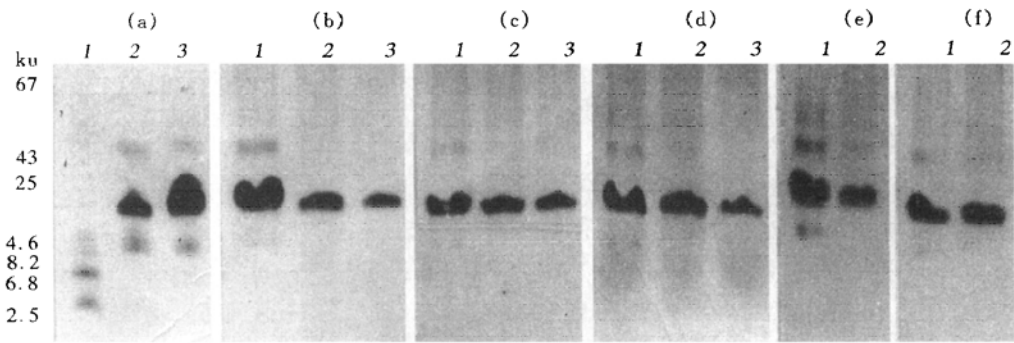


图 1 不同时间分析的 β_1 -AgTx 电泳图谱

a: 色谱分离纯化的 β_1 -AgTx, 1: 标准分子质量, 2: 酸溶 β_1 -AgTx, 3: 碱溶 β_1 -AgTx; b: 第 1 天分析的电泳图谱, 1: β_1 -AgTx, 2: β_1 -AgTx-OH⁻, 3: β_1 -AgTx-H⁺; c: 第 5 天分析的电泳图谱, 1: β_1 -AgTx, 2: β_1 -AgTx-OH⁻, 3: β_1 -AgTx-H⁺; d: 第 14 天分析的电泳图谱, 1: β_1 -AgTx, 2: β_1 -AgTx-OH⁻; 3: β_1 -AgTx-H⁺; e: 第 21 天分析的电泳图谱, 1: β_1 -AgTx, 2: β_1 -AgTx-OH⁻; f: 第 27 天分析的电泳图谱, 1: β_1 -AgTx, 2: β_1 -AgTx-OH⁻.

程的各样品发现, 其中酸溶 β_1 -AgTx- H^+ 样品似乎并不随储存时间的长短而产生明显的聚合谱带 (图 1b3~ d3). β_1 -AgTx 原始样品同样也始终保持着与图 1a 所示的相似图谱 (图 1b1~ f1). 唯有碱溶 β_1 -AgTx- OH^- 样品储存至第 14 天时便可明显地观察到除了一个分子质量为 15 ku 的主要谱带外, 还出现至少二个与 β_1 -AgTx 相对应的聚合谱带 (图 1d2), 然而, β_1 -AgTx- OH^- 样品储存到第 27 天时, 未观察到其聚合谱带有的明显增强 (图 1d2~ f2).

2.3 不同 β_1 -AgTx 成分的聚合现象

经双向电泳分析发现, β_1 -AgTx 实际上是由三个异构体组成, 它们的等电点分别为 pI 7.0, 5.8 和 5.4 (图 2a 左). 其中 pI 为 7.0

的谱带含量最高, 其次是 pI 为 5.8 的谱带, 含量最少的是 pI 为 5.4 的谱带. 酸溶 β_1 -AgTx- H^+ 显示了与 β_1 -AgTx 相似的双向电泳图谱特征 (图略). 而碱溶 β_1 -AgTx- OH^- 样品虽也由相似的三个异构体成分组成, 但其中 pI 为 7.0 的谱带却比 β_1 -AgTx 中的相应谱带明显要弱, 而 pI 为 5.4 的谱带则相对较强 (图 2a 右). 有趣的是, β_1 -AgTx 的三个异构体成分并不随着时程的延长其各自的含量有明显的变化, 而碱溶 β_1 -AgTx- OH^- 样品中的三个异构体成分的含量却随着时程的延长而呈动态的改变, 即 pI 为 7.0 的谱带成分含量逐渐减少, pI 为 5.8 的成分处中间过渡形式, pI 为 5.4 的成分含量则逐渐增大 (图 2b~ d).

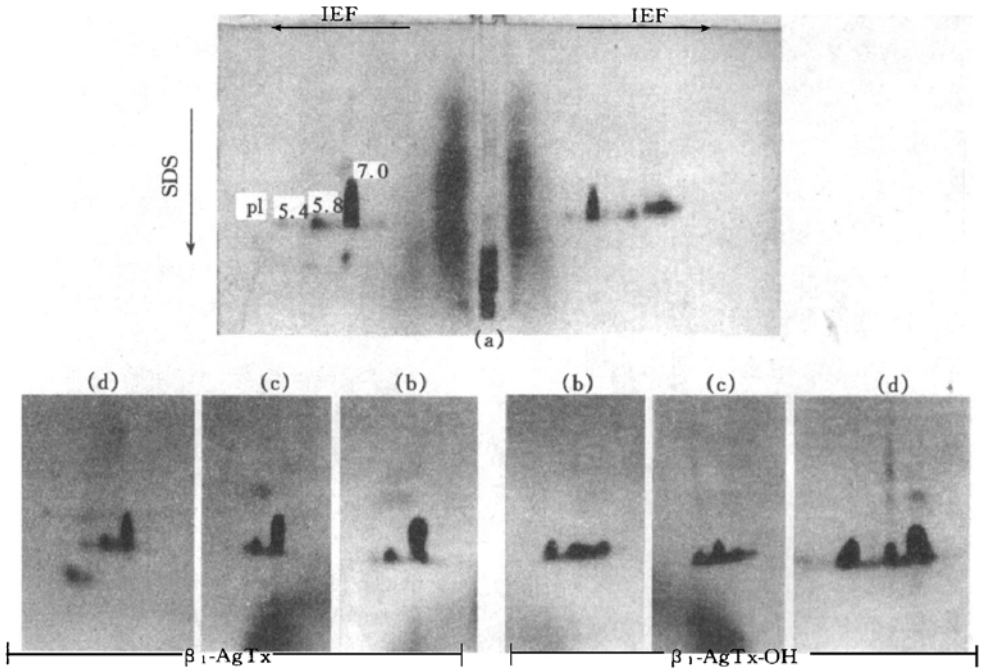


图 2 不同时间分析的 β_1 -AgTx 双向电泳图谱

(a) 第 1 天分析的电泳图谱, 左: β_1 -AgTx; 右: β_1 -AgTx- OH^- ; (b) 第 4 天分析的电泳图谱;
(c) 第 11 天分析的电泳图谱; (d) 第 20 天分析的电泳图谱.

3 讨 论

制备电泳是获取高纯度天然蛋白组分的一个常规有效手段. 数以百计不同种类的酶经 PAGE 或 SDS-PAGE 分离纯化仍可保持原有

的天然酶活性^[8]. 本工作用制备电泳方法. 对 β_1 -AgTx 毒素蛋白进行了进一步的纯化, 获得了两个纯度高于 98% 以上的毒素蛋白, 即酸溶 β_1 -AgTx- H^+ 和碱溶 β_1 -AgTx- OH^- 成分. 经生物毒性鉴定, 两个被纯化的毒素蛋白仍具

有较强的生物毒性, 它们对小白鼠的最小致死剂量均小于 100 μg .

作用于神经突触前的蛇毒素蛋白大致被分成两大类. 它们均由 120~ 123 个氨基酸残基组成. 在分子结构上, 这些毒素间均存在着或多或少的残基序列同源性; 在功能上, 它们均具有不程度的磷酸酯酶 A_2 的酶活性. 目前这些毒素蛋白不仅已成为用于探讨其突触前靶受体的必用工具物, 而且对该类毒素蛋白结构与功能关系的分子基础的理解也是国际学术界相当关注的一个热点. 中国产短尾蝮突触前神经毒素 (β -Agkistrodotoxins) 在分类上归属于第二组 (第一组以中国产 β -银环蛇神经毒素为代表), 由于其等电点呈中性特征, 故又被定义为中性磷酸酯酶 A_2 .

林政炯等最近分析了 β -Agkistrodotoxin 的空间结构图谱, 认为 β -Agkistrodotoxin 的分子中似乎应存在着两个局部易变域 (林政炯, 私人通信), 而且在晶体生长条件下 β -Agkistrodotoxin 似乎以多聚体的形式存在^[9]. 吉永华等^[2]曾在前文报道了两个 β -Agkistrodotoxins (β_1 -AgTx 和 β_2 -AgTx), 其中 β_2 -AgTx 毒素蛋白的氨基酸序列最近已被解析. 当比较 β_1 -AgTx 和 β_2 -AgTx 的序列结构时, 发现两者间仅存在两个部位的天然变异 (Val55 $\rightarrow$ Pro, Asn80 $\rightarrow$ Trp)^[3]. 有意义的是, 这两个变异残基部位恰分别座落在林政炯等提示的易变域内. 而本工作则又在电泳图谱上, 不但观察到了天然 β -Agkistrodotoxin 的聚合谱带, 而且还发现, 经电泳纯化获得的碱溶 β_1 -AgTx- OH^- 成分在 pH 为 7.5 左右的溶液中, 可出现与天然 β -Agkistrodotoxin 相似的聚合谱带, 但这些聚合谱带似乎处于一个相对稳定的平衡状态, 其含量并不随时程的延长而明显地增强. 另一值得注意的是, 经双向电泳分析意外地发现, 无论是天然的 β -Agkistrodotoxin 或经电泳纯化获得的碱溶 β_1 -AgTx- OH^- 成分均含有三个具有不同等电点 (pI 分别为 7.0, 5.8 和 5.4) 及不同含量比例的异构体谱带, β_1 -AgTx 中的三个异构体含量比并不随时程延长而明显

改变; 但碱溶 β_1 -AgTx- OH^- 成分中的三个异构体的含量却会随着时程的延长而发生显著的改变, 即处于等电点为 7.0 异构体的谱带含量逐渐减少, 处于等电点为 5.4 的异构体谱带含量逐渐增大, 而处于等电点为 5.8 的异构体谱带为中间过渡状态. 由此提示, β_1 -AgTx- OH^- 毒素蛋白在中性或偏碱性 pH 条件下, 其稳定性较差, 因而很可能造成其分子表面某些残基的脱氨作用, 使得其分子由相对带正电荷为主的 pI 为 7.0 的异构体逐渐变异至由带负电荷为主的 pI 为 5.4 的异构体; 或由于毒素空间构象的改变, 导致了其分子表面电荷性质的不同. 本工作对于进一步理解 β -Agkistrodotoxin 在不同 pH 和时程条件下的理化特征是有意义的.

致谢 真诚地感谢林政炯先生提供有关 β -Agkistrodotoxin 空间结构的分析资料和信息以及给予的热情讨论.

参 考 文 献

- 1 上海生理研究所第一研究室蛇毒组. 蝮蛇毒的神经毒成分的研究 I, 蝮蛇毒对神经系统的作用. 生物化学与生物物理学报, 1976, 8 (4): 351~ 355
- 2 吉永华, 陆丽芳, 徐 科等. 短尾蝮新突触前毒素和细胞毒素的纯化及部分序列. 中国科学 (B 辑), 1993, 23 (12): 1259~ 1266
- 3 Samejima Y, Yanagisawa M, Tomomatsu Y *et al.* Amino acid sequences of a presynaptic neurotoxin and a cytotoxin from venom of Pit viper, *Agkistrodon blomhoffi brevicaudus* Stejneger. In: Shanghai Institute of Physiology, Chinese Academy of Sciences ed. Third Congress of Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies. 1994. 139
- 4 任惠民, 章生良. 超薄板状聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳. 生物化学与生物物理进展, 1985, (4): 77~ 79
- 5 Fernander-Patron C, Calero M, Collazo P R *et al.* Protein reverse staining: high efficiency microanalysis of unmodified proteins detected on electrophoresis gels. Anal Biochem, 1995, 224: 203~ 211
- 6 Leammli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970, 227: 680~ 685
- 7 O'Farrell P H. High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem, 1975, 250: 4007~ 4021
- 8 Gabriel O, Gersten D M. Staining for enzymatic activity after gel electrophoresis. Anal Biochem, 1992, 203: 1~ 21

- 9 李东宁, 桂璐璐, 宋时英等. 蝮蛇蛇毒突触前神经毒素的结晶与分子聚集. 科学通报, 1995, 40 (1): 80~82

Observation of Polymerism and Isomerism of β -Agkistrodotoxin. REN Huimin, JI Yonghua (Shanghai Institute of Physiology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China).

Abstract β -Agkistrodotoxin (β_1 -AgTx), a presynaptic neurotoxin obtained from the venom of snake *Agkistrodon blomhoffii brevicaudus* (Jiangshu and Zhejiang Province, China) was further purified by the method of preparative electrophoresis. The polymerism was found in the native component of β_1 -AgTx and the puri-

fied β_1 -AgTx-OH⁻ which was solubilized in the slight basic solution (pH 7.5) by SDS-PAGE analysis, however, the amount of polymers seems to be stable observed in the different days. Moreover, by two-dimensional electrophoresis analysis, it was found that both components of β_1 -AgTx and β_1 -AgTx-OH⁻ were composed of three isoforms (pI 7.0, 5.8 and 5.4) with different contents, and the rate of content of isoforms in the component of β_1 -AgTx-OH⁻ was changeable observed in the different days, but not in the β_1 -AgTx.

Key words β -Agkistrodotoxin (β_1 -AgTx), β_1 -AgTx-OH⁻, polymerism, isomerism

腺苷酸激酶基因在大肠杆菌中的可溶性高表达

静恩烜 周波 罗杰 张洪杰

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 报道了鸡肌腺苷酸激酶基因的克隆和在温控启动子 P_{RPL} 调控下在大肠杆菌中的可溶性高效表达. SDS-PAGE 分析表明, 鸡肌腺苷酸激酶的含量可占大肠杆菌细胞总蛋白含量的 38%. 利用 Johnson 等的干冰/乙醇-冰水浴反复冻融法, 可将此重组蛋白进行富集, 纯度可达 85% 以上. 鸡肌腺苷酸激酶可与抗兔肌腺苷酸激酶单克隆抗体产生强的交叉反应.

关键词 大肠杆菌, 腺苷酸激酶, 可溶性高表达

腺苷酸激酶 (adenylate kinase, AK, EC. 2.7.4.3) 广泛存在于生命有机体中, 它催化 $MgATP + AMP \rightleftharpoons MgADP + ADP$ 反应, 通过这个反应来维持腺苷酸组成成分的体内平衡, 是有机体中一种重要酶类. 人类红细胞中 AK 酶的遗传缺陷会导致非球形红细胞溶血性贫血症; 在大肠杆菌细胞中 AK 酶结构基因的损伤可产生条件致死突变. 在脊椎动物中, AK 酶至少有两种类型的同工酶: 肌型 AK 酶 (AK1) 和肝型 AK 酶 (AK2). 这两种类型的酶的组织分布和在细胞内的定位不同, 而彼此

间在催化和免疫特性方面也不尽相同^[1,2]. 人们对肌型 AK 酶的研究比较深入, 对来自人、牛、猪、兔等 AK 酶的氨基酸序列分析表明, 它们具有相似的一级结构. X 射线衍射分析、核磁共振以及动力学的研究提示, 肌型 AK 酶分子中有分别与 $MgATP/MgADP$ 和 AMP/ADP 核苷酸相结合的位点, 然而到底哪些氨基酸残基参与同核苷酸的结合仍不完全清楚. 近来无论从晶体学还是从动力学的研究都