

东亚钳蝎昆虫毒素 BmK IT 的 初级结构研究*

吉永华 P.Mansuelle^① 徐科 C.Granier^① C.Kopeyan^①
S.Terakawa^② H.Rochat^①

(中国科学院上海生理研究所, 上海 200031; ① Laboratoire de Biochimie, CNRS URA 1455,

INSERM U 172, Faculté de Médecine Secteur Nord, Bd Pierre Dramard, 13326 Marseille

Cedex 15, France; ② 日本冈崎国立生理學研究所, 冈崎 444)

摘 要

从中国产东亚钳蝎 (*Buthus martensi* Karsch) 毒中纯化的一个昆虫毒素 BmK IT 经还原和羧甲基化处理, 分别用 TPCK-胰蛋白酶和金黄色葡萄球菌蛋白酶进行用 TLC-薄膜分离酶解的肽段并分别测定了它们的氨基酸顺序。将 BmK IT 及其酶解肽段的氨基酸顺序的测定结果与由非洲产蝎 *Androctonus australis* Hector 毒中纯化的昆虫毒素 AaH IT 的初级结构进行参照对比, 我们发现两种昆虫毒素的分子结构中仅有 16 个残基部位发生了变异, 其同源性高达 75% 以上。这一结果为探讨蝎昆虫毒素的分子结构特征以及结构与功能的相互关系提供了重要资料, 也为这类毒素的开发利用, 如作为神经生物科学研究中的工具物或探讨作为生物杀虫剂的可能性等提供了必要的分子基础。

关键词 东亚钳蝎、昆虫神经毒素、初级结构、构效关系

蝎毒中除有一类作用于哺乳动物的神经毒素外^[1-3], 还含有一类对昆虫具有专一选择性麻痹作用神经毒素, 被称为蝎昆虫毒素^[4,5]。虽然目前对后者的研究还明显地落后于对前者的研究, 但由于蝎昆虫毒素无论在理论上或在应用前景上都有着更多的实际意义, 近年来关于后者的研究已越来越多地引起了生物科学工作者的注意。根据作用效应的不同, 蝎昆虫毒素可分为引起昆虫收缩 (CP) 或软瘫 (FP) 麻痹两种类型^[6]。电生理和标记结合实验表明, 蝎昆虫毒素的特异结合位点是在昆虫神经细胞膜中的钠离子通道上^[7,8], 这和蝎哺乳动物毒素的结合位点主要是在哺乳动物神经细胞膜的钠离子通道上相似。已知的蝎昆虫毒素分子

1992-06-19 收稿, 1992-09-01 收修改稿。

* 国家自然科学基金、法国国立科研中心和日本文部省国际合作项目的部分资助。

大部分均是由 61—70 个氨基酸残基组成的单肽链, 分子内含有 4 对双硫键。在迄今已确立了分子初级结构的蝎昆虫毒素中属 CP 型者有 5 种, 即分别由非洲产蝎 *Androctonus australis* Hector 和 *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* 毒中纯化的 AaH IT, AaH IT₁ 和 AaH IT₂ 以及 Lqq IT₁ 和 Lqq IT₁^[9-11], 但它们之间在分子结构上只有极微小的差异, 应分别属两种蝎毒中的同一基因表达的同源物; 属 FP 型者有 3 种, 即 Lqh IT₂, Lqq IT₂ 和 Bj IT₂^[12]。此外, 还有一个被命名为 AaH IT₄ 的以及利用 cDNA 重组技术确定的、被命名为 Lqh α IT 的昆虫毒素的初级结构最近也已见报道^[13-14]。然而, 后两个蝎昆虫毒素与上述提及的 CP 或 FP 类型的蝎昆虫毒素相比, 不仅在分子结构上, 而且在对动物的作用专一性上都有着显著的差异。我们在前文中报道了从国产东亚钳蝎毒中纯化出了一个 CP 型的昆虫毒素 BmK IT 以及其部分氨基酸顺序^[15]。本工作则基本完成了 BmK IT 的初级结构的测定, 并对这类毒素的结构与功能相互关系进行了讨论。

1 实验与结果

1.1 BmK IT 的纯化

成体东亚钳蝎购自安徽省宿县地区的小型蝎养殖场, 剪下毒囊按文献[1]和文献[15]中所述方法提取与分离纯化 BmK IT。

1.2 毒性的检测

用苍蝇(*Sarcophaga argyrostoma*)幼虫, 即蛆和日本园蟋 (*Gryllus emma* Ohmachi) 成虫跟踪检测被分离组分的毒性。最终纯化的 BmK IT 引起苍蝇幼虫呈现收缩麻痹的最小效应剂量约为 7 ng/100 mg 体重, 引起蟋蟀麻痹最小致死剂量约为 1 μ g/500 mg 体重。

1.3 BmK IT 的还原和羧甲基化处理

参照文献[16]将约 35 nmol/L 的 BmK IT 样品溶解在 0.3 ml 的 5 mol/L 盐酸胍, 0.014 mol/L EDTA, 0.25 mol/L Tris- 醋酸 (pH 8.6) 缓冲液中, 然后加 2 mg 的 DTT。用黑纸包裹样品反应管并放置在 40°C 条件下保温 21 h 后, 再加 5 mg 的碘乙酸钠, 在室温下放置 30 min, 用一小块分子量限定在 3000 以下的透析滤膜封盖样品反应管的管口, 并对水透析 70 h, 除去样品处理液中的低分子物质, 用氮气吹干透析后的样品, 便成为 RCM-BmK IT 样品。

1.4 TPCK- 胰蛋白酶的酶解

将约 10 nmol/L 的 RCM-BmK IT 溶解在 50 μ l 的双蒸水和 200 μ l 的 N- 乙基吗啉 (0.2 mol/L, pH 8.1) 缓冲液中, 再加 10 μ g/10 μ l 的 TPCK- 胰蛋白酶 (美国 Sigma 产品) 酶/底物为 12:100。随即将此溶液放置于 37°C 条件下保温 4 h 进行酶解反应。

1.5 金黄色葡萄球菌蛋白酶的酶解

也取 10 nmol/L 的 RCM-BmK IT 样品, 用 100 μ l 双蒸水和等体积的上述缓冲液溶解, 加约 20 μ g/20 μ l 的金黄色葡萄球菌蛋白酶 (美国 Miles 实验室产品), 酶/底物约为 25:100。酶解反应是在 37°C 保温 60 h 条件下进行的。

1.6 酶解肽段的 TLC 薄膜分离

图 1(a) 和 (b) 分别为 TPCK- 胰蛋白酶和金黄色葡萄球菌蛋白酶的酶解肽段在 TLC 薄膜 (silica gel 60, 9 $\times$ 9 cm, 德国 Merck 公司产品) 上的分离示意图。将上述酶解溶液轻轻地滴在 TLC 薄膜的左下角处并用吹风机吹干。每块薄膜滴样品约 2 nmol/L 左右, 然后将薄膜放

置在 40% 的氨水和 60% 的乙醇混合碱性溶液中进行约 1.5 h 的第一向展层. 用吹风机吹干, 再将薄膜放入 9% 冰醋酸、51% 乙醇和 40% 双蒸水的酸性混合溶液中进行第二向展层. 展层完毕后, 用吹风机吹干, 先用 1% Ethyldiisopropylamine 丙酮喷雾固定并吹干, 再用 0.01% 的荧光胺 (Fluorescamine, 瑞士 E. Hoffman-La Roche 产品) 丙酮喷雾显色. 在 366 nm 紫外灯观察下, TPCK-胰蛋白酶的酶解液经薄膜层析分离可显示出 10 个较强的肽段荧光斑点, 依次从 No.1 至 No.10 进行标号. 金黄色葡萄球菌蛋白酶的酶解液在层析薄膜上显

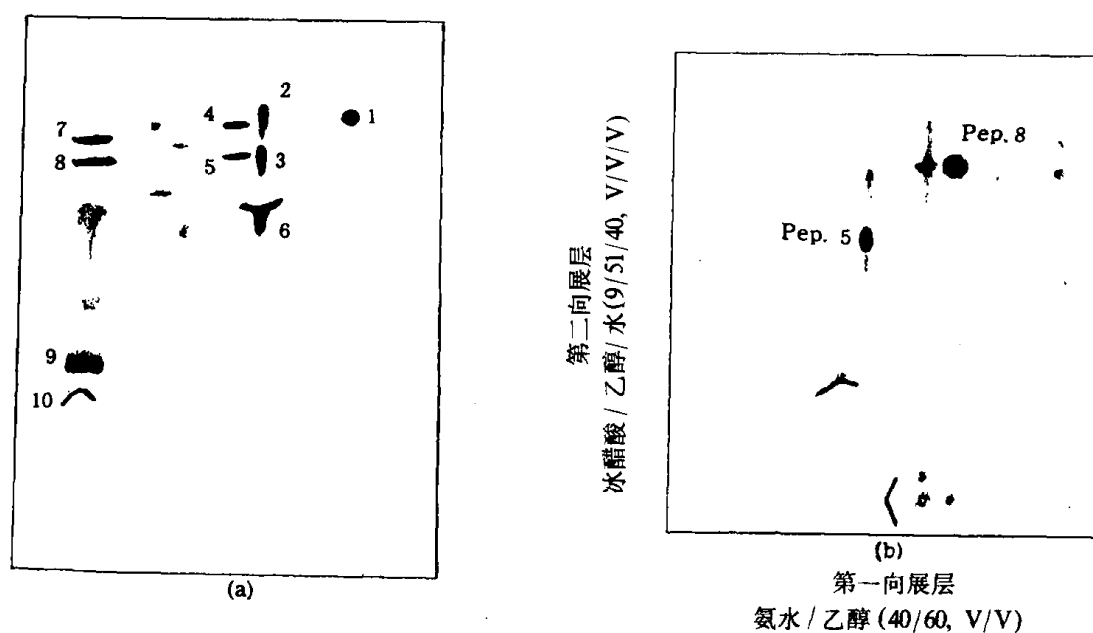


图 1 RCM-BmK IT 的 TPCK-胰蛋白酶 (a) 和金黄色葡萄球菌蛋白酶 (b) 酶解肽段在 TLC-薄膜 (Silica gel 60, 9×9 cm) 上的层析分离示意图谱

1.7 氨基酸组成分析

氨基酸组成的分析是在 Beckman 6300 自动分析仪上进行的. 表 1 给出了未经处理的 BmK IT (Native Protein) 的, RCM-BmK IT 的和根据氨基酸排列顺序计算的氨基酸组成的分析结果, 并比较了它们与 AaH IT 的异同^[9]. 两者均是由 70 个氨基酸残基组成. 在分子结构

段则由 4—5 个残基组成: 1(1.10) 个 Asp, 1(0.80) 个 Glu, 1 个 Val 和 1—2(1.41) 个 Ile.

表1 BmK IT 的氨基酸组成分析以及与 AaH IT 的比较

氨基酸	BmK IT 天然蛋白	BmK IT 蛋白	BmK IT 序列分析	AaH IT
Asp	11.62 (12)	9.64 (10)	(12)	12
Thr	2.96 (3)	3.36 (3)	(3)	4
Ser	5.37 (6)	5.71 (6)	(6)	6
Glu	2.09 (2)	2.34 (2)	(2)	3
Pro	0 (0)	0 (0)	(0)	1
Gly	4.30 (4)	4.43 (4)	(4)	4
Ala	4.17 (4)	4.63 (5)	(4)	3
1/2Cys	7.10 (8)	—	(8)	8
CMC	—	6.93 (8)	—	—
Val	4.63 (5)	5.02 (5)	(5)	3
Met	0 (0)	0 (0)	(0)	0
Ile	3.52 (4)	3.01 (3)	(3—4)	3
Leu	5.98 (6)	6.65 (7)	(6)	6
Try	7.18 (7)	6.28 (6)	(7)	6
Phe	1.04 (1)	1.11 (1)	(1)	1
His	0 (0)	0 (0)	(0)	1
Lys	7.88 (8)	7.46 (8)	(8)	8
Arg	0 (0)	0 (0)	(0)	1
Trp	未测	未测	(0)	0
总计	70	68	69—70	70

表2 RCM-BmK IT 的 TPCK-胰蛋白酶酶解肽段的氨基酸组成分析

氨基酸	肽段 1—12 (No.10)	肽段 13—21 (No.4)	肽段 13—28 (No.7)	混合肽段 13—18, 32—36, 37—40 (No.3)	肽段 29—31 (No.1)	混合肽段 32—36, 41—43 (No.5)	肽段 44—51 (No.8)	肽段 52—55 (No.6)	肽段 56—61 (No.9)	肽段 62— (No.2)
CMC	0 (0)	0.42 (1)	3.00 (3)	2.59 (3)	0.32 (0)	0.89 (1)	0.72 (1)	0 (0)	0 (0)	0.70 (1)
Asp	2.24 (2)	1.74 (2)	4.13 (4)	0 (0)	0.39 (0)	0 (0)	2.78 (3)	0 (0)	1.09 (1)	1.26 (1)
Thr	0 (0)	0 (0)	0.67 (1)	0.72 (1)	0.15 (0)	0.75 (1)	0 (0)	0 (0)	0.51 (1)	0 (0)
Ser	1.82 (2)	1.00 (1)	0.85 (1)	1.35 (2)	0.37 (0)	1.59 (2)	0.51 (0)	0 (0)	0.47 (0)	0.80 (1)
Glu	0 (0)	1.21 (1)	1.08 (1)	1.01 (1)	0.38 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1.24 (1)
Gly	2.35 (2)	0.70 (0)	0.55 (0)	1.15 (1)	0.47 (0)	1.17 (1)	1.49 (1)	0 (0)	0 (0)	0.41 (0)
Pro	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Ala	1.14 (1)	0 (0)	0 (0)	0.70 (1)	0.19 (0)	0.63 (1)	0.42 (0)	1.27 (1)	1.16 (1)	0 (0)
Val	1.09 (1)	0.43 (1)	0.44 (1)	0.75 (1)	0.99 (1)	0 (0)	0.28 (0)	0.89 (1)	0 (0)	1.13 (1)
Met	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Ile	0 (0)	0 (0)	0.43 (1)	0.54 (0)	0.30 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.14 (1)	1.37 (1—2)
Leu	0 (0)	2.13 (2)	1.92 (2)	4.04 (4)	0.37 (0)	0 (0)	0.86 (1)	0.92 (1)	0 (0)	0.54 (0)
Tyr	0.82 (1)	0.44 (1)	0.54 (1)	0.57 (1)	1.47 (2)	1.06 (2)	0.21 (0)	0 (0)	0 (0)	0.70 (1)
Phe	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.48 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
His	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Lys	2.87 (3)	0 (0)	1.05 (1)	0.55 (0)	0 (0)	0 (0)	0.95 (1)	1.53 (2)	0.91 (2)	0 (0)
Arg	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Trp	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
合计	12	9	16	15	3	8	8	5	6	7—8
得率 (%)	30	13	20	25	39	20	40	20	40	30

1.8 氨基酸顺序测定

氨基酸顺序的测定是根据文献[17]在 Beckman 890 mol/L 蛋白顺序仪上完成的. 未经处理的 BmK IT 和 RCM-BmK IT 均分别自 N-端自动地被降解至第 20 位. 其顺序为: KKNKYAVDSSGKVSECLLNN..., 这与前文发表的完全对应一致^[13]. TPCK-胰蛋白酶的酶解肽段 No.1, 6, 8 和 9 分别系由 3, 4, 8 和 6 个残基组成, 它们的顺序排列测定结果分别为: VYY., AVLK, CFGLDDDK 和 IKDATK. 酶解肽段 No.2 应含有 7—8 个氨基酸残基, 但对它的顺序测定只降解到第 5 位, SYCDV.... No.7 肽段系由 16 个残基组成, 其排列顺序为: VSECLLNN- YCNINCTK, 其中第 14 位上的 Cys 和第 16 位上的 Lys 残基在其顺序的降解中没有被检出. 它们是通过该肽段的氨基酸组成分析而确定的, 即其组成中给出的 1 个 Lys 残基可以认为是酶的作用位点而被定位在该肽段 C-末端第 16 位上, 3 个 Cys 中的 2 个已分别地被确定在该肽段的第 4 和第 10 位上, 那么另一个则理应座落在第 14 位上. 酶解肽段 No.3 和 5 的顺序测定结果发现, 它们分别是含 3 个(VSECLL, ATSGY, CCLL) 和 2 个(ATSGY, SCY) 肽段的混合物. 其中 No.3 中的 2 个肽段分别与 No.7 肽段的前 6 位的和 No.5 中的 1 个肽段的顺序是对应重叠的. 金黄色葡萄球菌蛋白酶的酶解肽段 Pep.5 也被仪器自动降解至第 5 位, 其顺序为: ATKSY..., 该结构肽段也可以通过 HPLC 的分离得到(资料未给出), 其完整的顺序是: ATKSYCD. 有意义的是, 这个结构联结了两个胰蛋白酶的酶解肽段 No.9 和 No.2 的顺序. Pep.8 只成功地检测出了前 2 位的序列: VQ....

1.9 BmK IT 的初级结构

图 2 是根据蝎神经毒素分子在结构上的保守性及其硫-硫键的对应排列位置, 再通过比较 BmK IT 自动降解和酶解肽段顺序与另一个来自非洲蝎毒 (*Androctonus australis* Hector) 中的昆虫毒素 AaH IT 的已知完整的氨基酸排列顺序的最大同源性^[9], 建立起的 BmK IT 的初级结构.

	1	1	2	3	4	5	6	7
	1	0	0	0	0	0	0	0
AaH IT	KKNKYAVDSSGKA	PECLLSNYC	NNQCTKVHYAD	KGYCCLLSCY	CFGLNDDK	KVLEISDTR	KSYCDTTI	IN
BmK IT	KKNKYAVDSSGKV	VSECLLNNYC	NINCTKVYYAT	SGYCCLLSCY	CFGLDDDK	AVLKIKD	ATKSYCDV	Q...
Native Protein	KKNKYAVDSSGKV	SE.LLNN.....						
RCM-Protein	KKNKYAVDSSGKV	VSECLLNN.....						
No.7		VSECLLNNYC	NINCTK					
No.1			VYY					
No.3		VSECLL		ATSGYCCLL				
No.5			ATSGY	SCY				
No.8					CFGLDDDK			
No.6						AVLK		
No.9							IKDATK	
No.2								SYCDV.
Pep.5							ATKSYCD	
Pep.8								VQ...

图 2 BmK IT 自动降解和 TPCK-胰蛋白酶酶解肽段的顺序测定
与已知的 AaH IT 完整氨基酸排列顺序的对应比较

2 讨 论

在本工作中,经分析发现,RCM-BmK IT 被 TPCK-胰蛋白酶酶解后,所切成的一些酶解肽段,如 No.1,3 和 5,并不是该酶的典型酶解位点,而是胰凝乳蛋白酶的作用结果。其原故可能是由于所应用的胰蛋白酶的酶比过高以及酶解时间过长所致。

对于 BmK IT C-末端第 67 位后的 2 或 3 个残基的排列顺序虽然在图 2 中没有标明,但根据氨基酸组成的分析提示,BmK IT 分子中含有约 12 个 Asp 和至少 3 个 Ile 残基,其中 11 个 Asp 和 2 个 Ile 残基已被分别地定位在分子结构中的第 3,8,19,20,23,24,25,48,49,50,56,58 和 65 位上。此外,由 4—5 个残基(各一个 Asp, Glu, Val 和 1—2 个 Ile)组成的金黄色葡萄球菌蛋白酶的酶解肽段 Pep.8 中的 Val 和 Gln 也已被确定在其蛋白分子中的第 66 和 67 位上,那么由此可以推断,BmK IT C-末端自第 67 位之后的顺序便可能与 AaH IT 的相同,也是一个 Ile.Ile.Asn 的特征结构,或为 Ile.Asn 的类似顺序。

尽管在图 2 所示的 BmK IT 分子中自第 29 位至第 55 位顺序尚缺少直接的重叠联接,然而,上面曾提及蝎神经毒素分子在结构上是相当保守的,并且,前文已提到^[15],BmK IT 与 AaH IT 在分子上已呈现出极大的同源性,不但都有着与其它各类蝎毒素不同的 Lys.Lys... 特征起始结构,而且两者的 N-末端前 12 肽的顺序也是完全相同的。据此,作为保守的特征结构片段,BmK IT 的酶解肽段 No.3 和 5 的 ATSGY, CCLL, SCY 序列以及 No.8 的 CFGLDDDK 序列应与 AaH IT 的第 32 至第 51 位的序列相对应,而 No.2 的 VYY 和 No.6 的 AVLK 序列则分别地与 AaH IT 的第 29 至第 31 位和第 52 至第 55 位的顺序相对应。

BmK IT 初级结构的建立,已经为这类毒素的结构与功能相互关系的研究提供了有价值的参考依据。例如 Loret 等人曾报道,在分别对 AaH IT₁ 分子中的第 30,34 和 60 位上的 His, Lys 和 Arg 残基进行选择性修饰后,毒素的生物活性以及对标记结合的抑制均未受到影响;若对其第 28 位或 51 位上的 Lys 残基进行特征修饰后,则毒素对昆虫的麻痹效应及抑制标记结合实验的能力均明显减弱^[10]。在 BmK IT 分子结构中,位于第 30,34 和 60 位上的相应残基分别为 Tyr, Ser 和 Thr,只是在第 28 和 51 位上座落的则同样是 Lys 残基。这样便提供了一个有力的佐证,即在具有 CP 效应的一类蝎昆虫毒素的分子结构中,其第 30,34 和 60 位上是否是一个带正电荷的残基对其生物活性似乎并不重要。相反,在第 28 和 51 位上的正电荷的残基则是必需的。此外,在 AaH IT 的分子中,第 14 位上是 Pro 残基,而在 BmK IT 的分子中,在该位置上却是 Ser 残基,该位置上这一特征残基的改变,势必会引起其空间构型的变化。因此,BmK IT 初级结构的建立,不但对了解这类昆虫毒素的空间结构,而且对探讨蝎神经毒素分子进化提供了资料,同时对开发这类毒素成为新型的生物杀虫剂等都有一定的参考价值。

致谢 作者热忱地感谢 Mrs. T. Brando 和 Mr. H. Hatori 在氨基酸分析方面的大力协助。

参 考 文 献

- [1] 吉永华、徐 科,生物化学和生物物理学报,1983, 15(6):517—521.
- [2] 吉永华、徐 科,生理科学进展,1986, 17(3):234—239.
- [3] 吉永华、施玉樑、徐 科,毒素的研究和利用,科学出版社,1986, 145—158.

- [4] 吉永华、陆丽芳, 生命的化学, 1990, 10(1):1—3.
- [5] 吉永华, 生物化学和生物物理进展, 1990, 17(2):100—105.
- [6] Zlotkin, E., Kadouri, D., Gordon, D., *Archives of Biochem. Biophys.*, 1985, 240(2):877—887.
- [7] Eitan, M., Fowler, E., Hermann, R. *et al.*, *Biochemistry*, 1990, 29:5941—5947.
- [8] Gordon, D., Jover, D., Couraud, F. *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta.*, 1984, 778:349—358.
- [9] Darbon, H., Zlotkin, E., Kopeyan, C. *et al.*, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1982, 20:320—330.
- [10] Loret, E. P., Mansuelle, P., Rochat, H. *et al.*, *Biochemistry*, 1990, 29(6):1492—1501.
- [11] Kopeyan, C., Mansuelle, P., Sampieri, F. *et al.*, *FEBS. Lett.*, 1990, 261:423—426.
- [12] Zlotkin, E., Eitan, M., Bindokas, V. P. *et al.*, *Biochemistry*, 1991, 30(19):4814—4821.
- [13] Loret, E. P., Martin-Eauclaire, M. F., Mansuelle, P. *et al.*, *Biochemistry*, 1991, 30(3):633—640.
- [14] Gurevitz, M., Urbach, D., zlotkin, E. *et al.*, *Toxicon*, 1991, 29(10):1270—1272.
- [15] 吉永华、木村能章、徐 科等, *Comp. Biochem. Physiol.*, 1988, 90C(1):237—240
- [16] Kopeyan, C., Miranda, F., Rochat, H., *Eur. J. Biochem.*, 1975, 58:117—122.
- [17] Bechis, G., Sampieri, F., Yuan, P. M. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 1984, 122:1146—1148.