

中华马氏钳蝎昆虫神经毒素 BmK I6 的 结晶和初步晶体学研究

管荣津 王 淼 刘新奇 王大成*

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101. * 联系人, wdc@pewdc.ibp.ac.cn)

摘要 从中华马氏钳蝎毒中分离纯化了一种兴奋型昆虫神经毒素 BmK 16, 以硫酸铵为沉淀剂, 在不同 pH 值下得到了它的两种晶型, 其中有一种是单晶, 在 Mar Research 345 面探测器上进行了衍射数据的收集, 其衍射能力可达 0.28 nm. 经 MOSFLM 6.0 软件处理, 确定其属于 C2 空间群, 它的晶胞参数为: $a = 4.65$ nm, $b = 8.52$ nm, $c = 3.26$ nm, $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 110.5^\circ$. 根据分子量和晶胞体积估算, 每个不对称单位含两个分子.

关键词 中华马氏钳蝎 昆虫神经毒素 晶体生长 初步晶体学

蝎毒主要由一些高度选择性地作用于动物神经系统的毒素组成, 这些毒素具有显著的种属专一性, 可以分为分别对哺乳动物、昆虫及甲壳动物作用的 3 种类型. 根据分子量的大小, 蝎神经毒素又可分为长链毒素和短链毒素两大类, 前者由 60~70 个氨基酸组成, 专一性地作用于 Na^+ 和 Ca^{2+} 通道, 而后者则是 30~40 个残基的小肽, 主要作用于 K^+ , Cl^- 通道. 根据毒理效应的不同, 长链昆虫毒素又可分为兴奋型和抑制型两种^[1], 兴奋型昆虫毒素注入蝇幼虫体内后诱发收缩性瘫痪, 而抑制型昆虫毒素则引起松软性瘫痪. 从一级结构来看, 抑制型昆虫毒素和哺乳动物毒素同源性很高, 而兴奋型昆虫毒素和哺乳动物毒素相差却很大, 而且它的二硫键排布方式和抑制型昆虫毒素以及哺乳动物毒素有着显著的差异, 所以研究兴奋型昆虫毒素的三维结构及其结构与功能的关系, 不仅可以帮助我们了解它与钠通道的作用机理和其发挥生物活性的结构基础, 而且对于研究昆虫和哺乳动物钠通道同源相关性以及毒素和离子通道的分子进化也非常有意义. 蝎昆虫毒素不仅是研究离子通道的良好工具, 同时, 它还具有鲜明的应用价值. 由于它的种属专一性和高效抗昆虫活性, 使它在研究生物杀虫剂以及转基因植物上有着重要的地位, 如 1990 年英国的 Stewart 等人^[2]在杆状病毒中重组了昆虫毒素 AaH IT, 大大增强了病毒对昆虫的杀伤能力. 另外, 在研究蝎昆虫毒素结构与功能关系的基础上, 通过蛋白质工程开发新型高效杀虫剂, 有着非常美好的前景^[3, 4].

目前对哺乳动物毒素三维结构的研究已经比较多了, 但对昆虫毒素结构的研究却很少. 研究昆虫毒素三维结构的最大障碍是难以得到足够量的纯度高、构象均一的昆虫毒素样品. 不久前 Oren 等人^[5]建立了昆虫毒素 Bj-xtrIT 的基因表达体系并纯化了 Bj-xtrIT, 用它培养晶体解出了它的三维结构. 但是从天然产物中分离纯化的昆虫毒素, 至今尚无晶体结构报道. 另外由于在基因水平和蛋白质水平蝎神经毒素存在着广泛的多型性, 因此对不同种属蝎神经毒素的研究都自成体系. 全蝎在我国一直作为名贵的中药材治疗一些神经系统疾病, 而且与国际上广泛研究的非洲蝎 (AaH) 及其他蝎神经毒素相比, BmK 蝎毒素有显著不同的结构特性^[6~8], 因此对 BmK 蝎毒素系列的研究具有我国资源和地域的显著特色. 我们从中华马氏钳蝎粗毒中分离得到一种兴奋型昆虫毒素 BmK I6, 本文报道对 BmK I6 的晶体生长和初步晶体学结果.

1 实验与结果

(i) 样品制备和性质鉴定. 蝎粗毒采自湖南常德地区, 系采用电刺激法排毒收集. 将粗毒经 Sephadex G-50 分子筛层析、SP Sephadex C-25 阳离子交换层析、等电聚焦制备电泳、Resource RPC 反相柱而制得昆虫神经毒素 BmK I6. 经 SDS-PAGE 凝胶电泳显示 BmK I6 具有均一的分子量, 大约在 8 ku 左右. 用薄层水平板等电聚焦电泳测定其等电点为 4.8. 经 AKTA Purifier 系统上 C8 反相柱分析为单峰, 说明 BmK I6 具有良好的纯度, 适合于晶体培养. BmK I6 的毒性测定, 采用体重大约为 30 mg 的苍蝇幼虫, 以腹腔注射方式向幼虫体内注射入一定剂量 BmK I6, 观察幼虫的中毒反应, 其中毒现象为发生快速收缩性瘫痪, 所以 BmK I6 是兴奋型昆虫毒素, 其 CPU(Contraction Paralysis Unit)为 0.5 μg /只幼虫, 属中强昆虫毒素.

(ii) 晶体生长. 采用微量悬滴汽相扩散法, 首先用 Hampton 公司的 Screen 和 Screen II 试剂对 BmK I6 晶体生长的条件在大范围内对沉淀剂和 pH 进行了搜索, 虽然没有得到晶体, 但在沉淀剂和 pH 值对样品溶解度的影响方面得到了一些有用信息. 最后以硫酸铵为沉淀剂, 在 pH = 5.0 的醋酸钠缓冲体系及 pH=9.5 的 CHES(2-[N-Cyclohexylamino]-ethanesulfonic acid) 缓冲体系中得到了晶体, 其中前者的单晶性很好. 晶体生长的详细条件见表 1.

表 1 BmK I6 晶体生长条件

	晶体 I	晶体 II
A 液	20mg BmK I6/mL H ₂ O	10mg BmK I6/mL H ₂ O
B 液	2.8 mol/L (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.2 mol/L NaC ₂ H ₃ O ₂ , pH = 5.0	1.4 mol/L (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.1 mol/L CHES, pH = 9.5
C 液	Isopropanol	10% HECAMEG
悬滴	1 μL A + 1 μL B	1 μL A + 1 μL B + 0.5 μL C
池液	450 μL B + 50 μL C	500 μL B
温度	22 $^{\circ}\text{C}$	22 $^{\circ}\text{C}$

晶体 I 经过一周即可得到薄片状单晶, 长宽各为 0.4 mm 和 0.1 mm, 但极薄, 不利于衍射数据的收集. 经尝试加入各种添加剂, 效果不明显. 后在相同条件下, 改用坐滴法生长, 并向池液中加入 0.4 mL Paraffin 油来减慢扩散, 晶体外形显著改善, 变成棒状晶体, 可达 0.5 mm \times 0.2 mm \times 0.1 mm, 适合于晶体学研究(图 1). 晶体 II 的重复性也很好, 但是成簇孪生

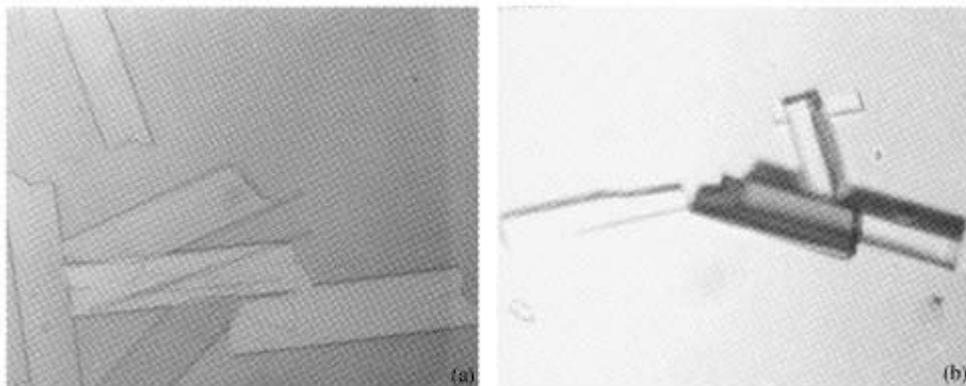


图 1 用悬滴法(a)和坐滴法(b)得到的 BmK I6 晶型I的晶体照片

片状晶体, 目前尚未得到可用的单晶, 正在继续优化和尝试接种.

(iii) 晶体衍射与初步晶体学分析. 在室温下, 晶体 I 的单晶在 Mar Research 345 面探测器上进行了数据收集, 在 40 kV 及 50 mA, 0.154 18 nm 的波长下, 晶体到面探测器距离为 100 mm, 曝光时间为 300 s, 扫描步长 1 度, 其衍射能力可达 0.28 nm. 收集到的衍射强度数据经过 MOSFLM 6.0 软件处理, 确定其空间群属于 C2, 晶胞参数为 $a = 4.65$ nm, $b = 8.52$ nm, $c = 3.26$ nm, $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 110.5^\circ$. 根据晶胞体积和分子量大小, 用 Mathews 系数的方法估算^[9], 确定晶体不对称单位中分子数为 2.

2 讨论

对蝎昆虫神经毒素的研究已经有很长一段历史了, 早在 1971 年以色列的 Zlotkin 等人^[10]就从 AaH 蝎子中首次分离得到昆虫毒素 AaH IT, 此后, 大约有 20 余种昆虫毒素被分离纯化, 但是直到不久前, 才有第 1 个晶体结构报道^[5], 也是目前唯一的一个. 阻碍蝎昆虫神经毒素空间结构研究的主要困难是得不到足够量的高纯度的样品. 由于在蝎毒液中存在着大量的同源性很高的毒素分子, 导致从中分离纯化某一种毒素分子非常困难. 在通过重组途径获得纯化样品方面, 稳定高效的昆虫毒素表达体系至今尚无正式报道. 最近我们实验室克隆了 BmK 蝎毒中另一个同源的昆虫毒素 BmK I4^[11], 正在构建它的高效表达体系. 我们在纯化 BmK I6 时也发现要得到它的高纯度样品很难, 所以用了分辨率很高的等电聚焦制备电泳和反相制备柱来作为纯化手段.

结晶过程中发现样品的纯度对晶体培养十分关键, 对此前面已有所讨论. 开始用的样品是从等电聚焦制备电泳得到的, 在寻找晶体生长条件上花费了很多时间, 虽然用硫酸铵得到了微晶, 但重复性很差. 后来用反相柱进一步纯化了样品, 很快就在硫酸铵体系中得到了单晶, 而且不久又得到了晶体 II. 两种晶体的重复性都很好.

晶体 I 对 pH 不是很敏感, 在 4.5 到 5.5 之间都出, 差别不是很大; pH 对晶体 II 有较大影响, 虽然从 7.5 到 10.0 都出, 但 pH 越高晶核越少, 而且孪化得越轻.

在 BmK I6 晶体 I 的生长过程中, 扩散动力学的影响十分显著. 采用悬滴汽相扩散法生长时, 得到的是薄片状晶体; 当在相同条件下改成坐滴汽相扩散法生长时, 其扩散动力学显著改变, 晶体外形变成长棒状. 通过向池液中加入 200~400 μ L 的矿物油来减缓扩散速率, 也可以使晶形得到改善. 最后用这种控制扩散的方法得到了 0.5 mm \times 0.2 mm \times 0.1 mm 的晶体. 所以本实验表明, 在蛋白质晶体生长实验中, 结晶体系的扩散特性是影响晶体生长和晶体质量的重要因素.

BmK I6 的两个晶体生长条件中均含有有机小分子作为添加剂, 晶体 I 是在含 10% 的异丙醇下生长的, 异丙醇的浓度可稍作变动; 晶体 II 是在含 2% 的去污剂 HECAMEG 下生长的. 另外 BmK I6 还在 70% 的 MPD, 10% 异丙醇、醋酸缓冲液(pH = 5.0)中长出过成簇针状微晶以及 30% PEG-MME 550, 10% MPD, HEPES pH=7.5 得到棒状微晶, 均因难以优化而放弃. 这些都可以说明有机小分子在 BmK I6 的结晶过程中起着相当重要的作用. 这也是和纯化过程中发现 BmK I6 有较强的疏水性相一致的. 推测这些小分子由于它们的两亲特性, 和蛋白质分子表面相互作用, 改善了溶液中蛋白质分子间的相互作用, 提高了蛋白质晶体生长的可能性. 本实验也表明在结晶蛋白质的实验中, 适当地选用有机小分子作为添加剂, 有时是十

分有效的方法.

致谢 衍射数据是在中国科学院生物物理研究所生物大分子国家重点实验室收集的,感谢赵旭东先生在数据收集方面的帮助.本工作为国家基础研究攀登计划(A)和“八六三”高技术计划及“九二一”工程资助项目.

参 考 文 献

- 1 Zlotkin E, Eitan M, Pelhate M, et al. Insect specific neurotoxins from scorpion venom that affect sodium current inactivation. *J Toxicol-Toxin Reviews*, 1994, 13: 25 ~ 43
- 2 Stewart L M D, Hirst M, Ferber M L, et al. Construction of an improved baculovirus insecticide containing an insect-specific toxin gene. *Nature*, 1991, 352: 85 ~ 88
- 3 Cory J S, Hirst M L, Williams T, et al. Field trial of a genetically improved baculovirus insecticide. *Nature*, 1994, 370: 138 ~ 140
- 4 Gersburg E, Stockholm D, Fory O, et al. Baculovirus-mediated expression of a scorpion depressant toxin improves the insecticidal efficacy achieved with excitatory toxins. *FEBS Lett*, 1997, 422: 132 ~ 136
- 5 Oren D, Fory O, Amit E, et al. An excitatory scorpion toxin with a distinctive feature: an additional α helix at the C terminus and its implication for interaction with insect sodium channels. *Structure*, 1998, 6: 1095 ~ 1103
- 6 Li H M, Zhao T, Jin L, et al. A series of bioactivity-variant neurotoxins from scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Acta Cryst*, 1999, D55: 341 ~ 344
- 7 Li H M, Wang D C, Zeng Z H, et al. Crystal structure of an acidic neurotoxin from scorpion *Buthus martensii* Karsch at 1.85Å resolution. *J Mol Biol*, 1996, 261: 415 ~ 431
- 8 He X L, Li H M, Zeng Z H, et al. Crystal Structures of two α -like scorpion toxins: Non-proline *cis* peptide bonds and implications for new binding site selectivity on the sodium channel. *J Mol Biol*, 1999, 292: 125 ~ 135
- 9 Mathews B W. Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol*, 1968, 33: 491 ~ 497
- 10 Zlotkin E, Rochat H, Kopeyan C, et al. Purification and properties of the insect toxin from the venom of the scorpion *Androctonus australis* Hector. *Biochimie*, 1971, 53: 1073 ~ 1078
- 11 Xiong Y M, Lan Z D, Wang M, et al. Molecular characterization of a new excitatory insect neurotoxin with an analgesic effect on mice from scorpion BmK. *Toxicon*, 1999, 37: 1165 ~ 1180

(1999-08-02 收稿, 1999-11-23 收修改稿)