

[研究简报]

一种新型独特芋螺毒素的分离与结构鉴定

刘尚义, 曹 瑛, 赵听友, 代先东, 钟明磊, 范崇旭, 陈冀胜
(解放军防化研究院第四研究所, 北京 102205)

关键词 芋螺毒素; T-超家族; 独特芋螺; 结构鉴定

中图分类号 Q51; O629

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2006)08-1482-03

芋螺是热带海洋软体有毒动物, 属于腹足纲新腹足目毒舌总科芋螺科. 全世界约有 500 余种芋螺, 主要分布在太平洋和印度洋热带海域^[1,2]. 芋螺是食肉性动物, 根据其食性可将其分为食鱼芋螺、食软体动物芋螺和食虫芋螺 3 大类, 它们主要依靠强有力的毒液装置捕食和防御^[1,3]. 每种芋螺的毒液中大约含有 50 ~ 200 种活性多肽(又称芋螺毒素), 不同种芋螺所含的毒素也各不相同, 因此芋螺毒液可以说是一个庞大的天然活性多肽宝库^[4].

1978 年, Cruz 等^[5,6]从地纹芋螺(*Conus geographus*)毒液中分离纯化出第一种芋螺毒素. 至今已有百余种芋螺毒素被分离鉴定, 它们一般由 10 ~ 35 个氨基酸残基组成, 多数含有形成链内二硫键的 Cys 残基. 芋螺毒素主要作用于细胞膜上的各种离子通道和神经递质及激肽的受体, 具有高度的选择性和亲和力, 可以作为离子通道和膜受体研究的工具^[7,8], 同时可能被直接开发成药物或作为新药先导化合物. 因此, 芋螺毒素的生物化学、分子生物学和药理学等研究受到了广泛关注.

我们从中国南海的一种食虫芋螺——独特芋螺(*Conus characteristicus*)的毒液中分离得到一种新的芋螺毒素, 对其进行了结构鉴定和化学合成. 结果表明, 这是一种新的 T-超家族芋螺毒素.

1 实验部分

1.1 试剂和仪器 乙腈(色谱纯, 北京昌化精细化工厂); 三氟乙酸(色谱纯, Sigma 公司, 美国); 芴甲氧羰基(Fmoc)保护 L-氨基酸均为美国 Advanced ChemTech 公司产品; 凝胶(Sephadex G25 SF, Pharmacia); 实验用水均为重蒸去离子水; 其余试剂均为分析纯试剂.

美国 Agilent 公司 1100 型高效液相色谱仪; 美国 Millipore 公司 Milli-Q 型超纯水装置; 德国 Bruker 公司 BIFLEX III 型 MALDI-TOF 质谱仪; 美国 PE 公司 ABI 491 型蛋白测序仪; 美国 Beckman 公司 121MC 型氨基酸自动分析仪; 美国 Vydac 公司 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 30 nm; 10 mm × 250 mm, 5 μm, 30 nm).

1.2 粗毒素的提取 将冷冻的独特芋螺样品(约 50 只)解剖取出毒液管, 将毒液管剪碎后, 向其中加入 50 mL 0.2 mol/L 乙酸水溶液, 冰浴冷却下匀浆. 再加入 150 mL 0.2 mol/L 乙酸水溶液搅拌提取, 离心(3 000 r/min, 20 min), 取上清液冷冻干燥, 得到浅黄色粉末状固体即为粗毒素(1 050 mg).

1.3 凝胶色谱分离 将粗毒素用 0.2 mol/L 乙酸水溶液溶解, 离心(3 000 r/min, 10 min), 取上清液进行凝胶色谱分离(Sephadex G25 SF 柱, 2.5 cm × 94 cm), 用 0.2 mol/L 乙酸水溶液于 4 °C 洗脱, 流速 0.7 mL/min, 280 nm 检测, 收集各组分, 分别冻干.

1.4 高效液相色谱分离纯化 对凝胶色谱分离得到的组分 III 用 HPLC 进一步分离纯化, Vydac C₁₈ 半制备柱(10 mm × 250 mm); 流动相: (A) 体积分数为 0.1% 的 TFA-水溶液, (B) 体积分数为 0.1% 的 TFA-乙腈溶液; 洗脱梯度: 0 ~ 45% B, 0 ~ 45 min; 流速 2 mL/min; 检测波长: 214 nm. 对半制备得到的各组分用 Vydac C₁₈ 分析柱(4.6 mm × 250 mm)再次纯化, 洗脱梯度: 20% ~ 50% B/0 ~ 30 min; 流

收稿日期: 2005-08-04.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20272083)资助.

联系人简介: 范崇旭(1965 年出生), 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 从事天然产物化学及多肽研究. E-mail: fancx@263.net

速: 1 mL/min, 其余分离条件同上.

1.5 序列测定 将多肽的二硫键用二巯基苏糖醇(DTT)还原, 并用丙烯酰胺衍生后再进行序列分析, 采用 ABI 491 型蛋白测序仪用标准 Edman 降解方法测序.

1.6 线性肽合成 采用 Fmoc[*N*-(9-fluorenyl) methoxycarbonyl] 保护策略对 cr5a 可能的两种二硫键形式进行了固相合成. 树脂为 Wang 树脂(1.30 mmol/g), 各侧链保护的氨基酸分别选用 Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH 和 Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OBu')-OH, Cys 残基采用 *S*-Trt(trityl) 或 *S*-Acm(acetamidomethyl) 成对保护. 其中一个异构体 A 的 Cys¹ 和 Cys¹⁰ 采用 *S*-Trt 保护, Cys² 和 Cys¹¹ 采用 *S*-Acm 保护; 而另一个异构体 B 的 Cys¹ 和 Cys¹¹ 采用 *S*-Trt 保护, Cys² 和 Cys¹⁰ 采用 *S*-Acm 保护. C 端的第一个氨基酸残基 Fmoc-Glu(OBu')-OH 制备成对称酞后与 Wang 树脂连接, 以体积分数为 20% 的吡啶/*N,N'*-二甲基甲酰胺(DMF)溶液作为脱保护剂, 肽键形成采用 HBTU 方法偶联, 直至得到所需要的线性肽树脂.

肽树脂裂解液为 0.75 g 苯酚、0.25 mL 1,2-二巯基乙烷(EDT)、0.5 mL 硫代苯甲醚、0.5 mL 水和 10 mL 三氟乙酸(TFA)的混合液, 在室温下反应 1.5 h, 用冰冷的无水乙醚沉淀出线性肽. 将粗肽溶于体积分数为 10% 的乙腈水溶液, 利用 HPLC 分析柱进行纯化, 纯化条件与天然毒素的 HPLC 分离条件相同.

1.7 二硫键形成 异构体 A 的 Cys¹-Cys¹⁰ 和异构体 B 的 Cys¹-Cys¹¹ 二硫键的形成采用空气氧化法. 将 2.4 mg 线性肽溶于 30 mL 体积分数为 40% 的乙腈和 0.01 mol/L NH₄HCO₃ (pH = 8.4) 溶液中, 室温下敞口搅拌 23 h, HPLC 分析监测可知反应完成. 用 0.05 mol/L HOAc 终止反应. 反应液减压浓缩后, 利用 HPLC 分析柱进行纯化, 得到单环肽.

单环肽中 Cys 残基的 Acm 保护用碘氧化法脱除并形成第二对二硫键. 将 100 μg 单环肽溶于 200 μL 体积分数为 20% 的乙腈水溶液(其中含体积分数为 10% 的 TFA)中, 加入 30 μL 碘的乙腈溶液(5 mg/mL), 混匀后反应 10 min, 加入 30 μL 抗坏血酸水溶液(5 mg/mL)终止反应; 向反应液中加入 400 μL 水稀释后, 利用 HPLC 分析柱进行纯化, 纯化条件与天然毒素的纯化相同.

2 结果与讨论

2.1 凝胶色谱分离与 HPLC 纯化 将提取得到的粗毒素经凝胶色谱进行分离, 氨基酸组成分析检测结果表明, 其中 III, IV, V 3 个组分中含有多肽. 将组分 III 进一步用 HPLC 进行纯化, 得到的 cr5a 用分析柱进行第二次纯化, 得到纯毒素.

2.2 质谱分析和序列测定 cr5a 的 MALDI-TOF 质谱分析结果为 [M + H]⁺ (1 594.6), [M + Na]⁺ (1 616.6) 和 [M + K]⁺ (1 632.6), 因此可知 cr5a 的分子量为 1 593.6. cr5a 的二硫键还原后使用丙烯酰胺进行衍生, 用蛋白自动测序仪测序. 其氨基酸序列为 CCKFQFLNFCNE, C-末端为自由羧基时的计算分子量为 1 593.6(单同位素分子量), 与测定值 1 593.6 相符.

2.3 化学合成 测定的 cr5a 序列得到了化学合成结果的证实. 通过 Fmoc 法逐步合成得到两种不同 Cys 保护的线性肽, 再经过空气氧化和碘氧化后得到两种异构体(如图 1).



Fig. 1 Two synthetic isomers of cr5a

异构体 A 和 B 的质谱分析结果表明, 其 [M + H]⁺ 的测定值分别为 1 594.9 和 1 595.0, 与理论值 1 594.6 相符, 将合成异构体与天然毒素 cr5a 同时进行 HPLC 分析, 结果表明, 异构体 A 的色谱行为与 cr5a 一致, 说明它们的二硫键连接方式相同, 即 Cys¹-Cys¹⁰, Cys²-Cys¹¹. 因此, 可以确定 cr5a 的氨基酸序列为 CCKFQFLNFCNE, 二硫键的连接方式是 Cys¹-Cys¹⁰, Cys²-Cys¹¹.

T-超家族是芋螺毒素的一大家族, 大多数成员都具有保守的 Cys 骨架(CC-CC)^[9-12] (见表 1). 本文分离鉴定的独特芋螺毒素 cr5a 也具有同样的 Cys 骨架, 而且其二硫键连接方式也与文献[9]已确定的 au5a 和 p5a 连接方式相同. 因此, 可以确认 cr5a 是芋螺毒素 T-超家族新的成员. 与其它成员不同的是, 在保守的二硫键骨架中(loop 长度), cr5a 有 7 个氨基酸残基, 而其它已知的 T-超家族芋螺毒素只有 4 或 5 个氨基酸残基.

Table 1 T-superfamily conotoxins^a

Conotoxins	Species	Prey	Sequence	Ref.	Conotoxins	Species	Prey	Sequence	Ref.
au5a	<i>C. aulicus</i>	Molluscs	FCCPFIRYCCW	[9]	vc5a	<i>C. victoriae</i>	Molluscs	CCPGKOCRI ^b	[10]
au5b	<i>C. aulicus</i>	Molluscs	FCCPVIRYCCW	[9]	mr10a	<i>C. marmoreus</i>	Molluscs	NGVCCGYKLCHOC	[11]
tx5a	<i>C. textile</i>	Molluscs	γ CC γ DGW [#] CCT [^] AAO	[9]	mr5a	<i>C. marmoreus</i>	Molluscs	NACCIVRQCC	[12]
p5a	<i>C. purpurascens</i>	Fish	GCCPKQMRCC ^L	[9]	cr5a	<i>C. characteristicus</i>	Worms	CCKFQFLNFCCNE	This work

a. γ : Gamma-carboxyglutamic acid; W[#]: bromotryptophan; T[^]: O-glycosylated threonine; O: 4-trans-hydroxyproline; b. C-terminal amidation.

参 考 文 献

- [1] White J. . Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons[M], Boca Raton, FL: CRC Press, 1995: 117—127
 [2] Myers R. A. , Cruz L. J. , Rivier J. E. *et al.* . Chem. Rev. [J], 1993, **93**: 1923—1936
 [3] LI Feng-Lan(李凤兰). Marine Sciences(海洋科学)[J], 1995, **36**: 245—266
 [4] Olivera B. M. . Mol. Biol. Cell[J], 1997, **8**(11): 2101—2109
 [5] Cruz L. J. , Gray W. R. , Olivera B. M. . Arch. Biochem. Biophys. [J], 1978, **190**(2): 539—548
 [6] Gray W. R. , Luque A. , Olivera B. M. *et al.* . J. Biol. Chem. [J], 1981, **256**(10): 4734—4740
 [7] McIntosh J. M. , Olivera B. M. , Cruz L. J. . Methods Enzymol. [J], 1999, **294**: 605—624
 [8] Terlau M. , Olivera B. M. . Physiol. Rev. [J], 2004, **84**(1): 41—68
 [9] Walker C. S. , Steel D. , Jacobsen R. B. *et al.* . J. Biol. Chem. [J], 1999, **274**(43): 30664—30671
 [10] Jakubowski J. A. , Keays D. A. , Kelley W. P. *et al.* . J. Mass Spectrom. [J], 2004, **39**: 548—557
 [11] McIntosh J. M. , Corpuz G. O. , Layer R. T. *et al.* . J. Biol. Chem. [J], 2000, **275**(42): 32391—32397
 [12] Han Y. H. , Wang Q. , Jiang H. *et al.* . Toxicon[J], 2005, **45**(4): 481—487

Isolation and Structure Characterization of a New T-Superfamily Conotoxin from *Conus Characteristicus*

LIU Shang-Yi, CAO Ying, ZHAO Ting-You, DAI Xian-Dong, ZHONG Ming-Nai,

FAN Chong-Xu^{*}, CHEN Ji-Sheng

(The 4th Department, Institute of Chemical Defense, PLA, Beijing 102205, China)

Abstract Cone snails are tropical marine predatory molluscs, and there is an unprecedented variety of neuropharmacologically active peptide. Over seventy living species of cone snails are distributed in China. The venom of *Conus characteristicus* collected from South China Sea was studied in this work. A new conotoxin, cr5a, was isolated from the venom through Sephadex G-25 chromatography and HPLC, and then was identified by amino acid analysis, mass spectrometry, N-terminal sequence. The primary structure of cr5a was CCKFQFLNFCCNE, it shared a conserved T-superfamily of conotoxins arrangement of cysteine residues(CC-CC). Total chemical synthesis of the two possible disulfide linkages of cr5a was achieved, and the result of HPLC co-elution showed that cr5a was a tridecapeptide with a disulfide connectivity of Cys¹-Cys¹⁰, Cys²-Cys¹¹. So cr5a is a new member of the T-superfamily conotoxins.

Keywords Conotoxins; T-superfamily; *Conus characteristicus*; Structure characterization

(Ed. : H, J, Z)