

动物学报 51(6):1102-1108, 2005

*Acta Zoologica Sinica*

# 重组 $\alpha$ -银环蛇毒素 P22-A31 的原核表达及功能分析\*

林鲁萍<sup>1</sup> 汪芳<sup>1</sup> 章晓波<sup>2</sup> 王义权<sup>1\*\*</sup>

1. 厦门大学生命科学学院, 厦门 361005

2. 国家海洋局第三海洋研究所, 厦门 361005

**摘要**  $\alpha$ -银环蛇毒素在神经科学研究以及在临床和制药上有重要作用, 为获得大量的  $\alpha$ -银环蛇毒素, 我们用已构建的 pGEX-BgTX (P22-A31) 质粒在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达, 并用谷胱甘肽 Sepharose FF 纯化 GST- $\alpha$ -银环蛇毒素融合蛋白, 再用凝血酶切掉融合标签谷胱甘肽转移酶 (Glutathione S-transferase, GST), 得到了较纯的重组  $\alpha$ -银环蛇毒素同工毒素, 得率约为 1.225 mg/L。用重组  $\alpha$ -银环蛇毒素制备多克隆抗体, 经 ELISA 和 Western 杂交鉴定后可知重组  $\alpha$ -银环蛇毒素与天然  $\alpha$ -银环蛇毒素的抗原性一致。小鼠毒性试验表明, 重组  $\alpha$ -银环蛇毒素同工毒素的半致死剂量 LD<sub>50</sub> 为 1.598 mg/kg, 约为天然  $\alpha$ -银环蛇毒素的 1/5。小鼠化学法镇痛试验显示, 重组  $\alpha$ -银环蛇毒素有一定的镇痛药效, 1/4 LD<sub>50</sub> 剂量的镇痛百分率为 55.2%, 1/8 LD<sub>50</sub> 剂量的镇痛百分率为 20.5%, 在外周镇痛作用中呈一定的量效关系 [动物学报 51(6):1102-1108, 2005]。

**关键词**  $\alpha$ -银环蛇毒素 蛇毒 基因表达 活性

## Expression and functional analysis of recombinant $\alpha$ -bungarotoxin (P22-A31)\*

LIN Lu-Ping<sup>1</sup>, WANG Fang<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-Bo<sup>2</sup>, WANG Yi-Quan<sup>1\*\*</sup>

1. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China

2. The Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China

**Abstract**  $\alpha$ -bungarotoxin plays very important role in neuroscience research, clinical application and the pharmaceutical industry. In order to acquire quantities of  $\alpha$ -bungarotoxin, we expressed GST- $\alpha$ -bungarotoxin fusion protein using constructed plasmid pGEX-BgTX (P22-A31) in *E. coli* BL21 (DE3) cell, purified GST- $\alpha$ -bungarotoxin using glutathione-Sepharose FF, cleaved Glutathione S-transferase (GST) tag by thrombin in the column, and finally, we obtained recombinant  $\alpha$ -bungarotoxin with yields of about 1.225 mg/L. In order to compare the immunogenicity of recombinant protein and crude  $\alpha$ -bungarotoxin, we prepared multi-antibody using recombinant  $\alpha$ -bungarotoxin. The results of both ELISA and Western blot showed that recombinant  $\alpha$ -bungarotoxin has the same antigenicity as natural  $\alpha$ -bungarotoxin. *In vivo* toxicity tests showed that the LD<sub>50</sub> of recombinant  $\alpha$ -bungarotoxin was 1.598 mg/kg, about 1/5 that of natural  $\alpha$ -bungarotoxin. Analgesis percentages with doses of 1/4 LD<sub>50</sub> and 1/8 LD<sub>50</sub> were 55.2% and 20.5% respectively, indicating that recombinant  $\alpha$ -bungarotoxin possesses analgesic efficiency [Acta Zoologica Sinica 51(6):1102-1108, 2005].

**Key words**  $\alpha$ -bungarotoxin, Snake venom, Gene expression, Function

蛇毒神经毒素是蛇毒中毒性最大的组分, 它能使动物产生迟缓性麻痹和呼吸衰竭, 从而导致动物死亡, 其中的突触后神经毒素能与肌肉运动终板的 N-乙酰胆碱受体 (nAChR) 结合, 阻止神经-肌肉传导。因此, 突触后神经毒素可以作为检测

nAChR 的标记物、纯化乙酰胆碱受体 (AChR)、研究药物与受体相互作用和 AChR 结构与性质的工具 (覃公平, 1998); 同时神经毒素也具有较高的医用价值, 有良好的镇痛 (Chen and Robiso, 1990; Pu et al., 1995)、解毒和抑癌作用 (陈远

2005-06-07 收稿, 2005-07-16 接受

\* 国家自然科学基金 (No. 30470938) 和教育部留学回国人员启动基金资助 [This research was funded by the grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 30470938) and SRF for ROCS, SEM]

\*\* 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: wangyq@xmu.edu.cn

© 2005 动物学报 *Acta Zoologica Sinica*

聪、袁士龙, 1988); 应用蛇毒神经毒素镇痛不会成瘾、无耐药性, 而且显示疗效后剂量还可以减少, 因此有望用于戒毒治疗 (杨良等, 1995)。

$\alpha$ -银环蛇毒素是银环蛇 (*Bungarus multicinctus*) 的一种典型的长链突触后神经毒素, 分子量不大, 是由 74 个氨基酸组成的碱性多肽, 分子中几乎每个氨基酸都对结构的形成发挥作用, 其中包含的 10 个半胱氨酸, 形成 5 对二硫键 (Clark et al., 1972), 具有三指型空间结构, 为探讨蛋白一级结构与高级结构的关系、以及结构和功能的理想材料, 可用于研究其与乙酰胆碱的结合位点和活性部位 (Rosenthal et al., 1994; Samson et al., 2000; Zeng et al., 2001; Scarselli et al., 2002)。 $\alpha$ -银环蛇毒素在临床上还可用于诊断重症肌无力、治疗顽固性神经痛、肌萎缩性侧索硬化症和复发性疱疹性角膜损伤等 (段清海等, 1998)。鉴于  $\alpha$ -银环蛇毒素在神经科学研究以及在临床和制药上的重要作用, 如何获得大量的  $\alpha$ -银环蛇毒素蛋白逐渐成为这一研究领域的一项重要任务。目前, 蛇神经毒素的主要来源是捕蛇取毒, 进一步分离纯化, 这样获得的  $\alpha$ -银环蛇毒素不但成本高、周期长、质量难以稳定, 而且长期下去还会耗竭生物资源, 破坏生态平衡。基因工程技术的发展使得大量生产蛇神经毒素成为可能, 国内早在 1998 年就有用人工合成的  $\alpha$ -银环蛇毒素基因研究其原核表达的报道 (段清海, 1999)。实际上, 人们早已在自然界中发现  $\alpha$ -银环蛇毒素基因多态性的现象 (Liu et al., 1998), 但这种多态性的生物学意义是什么? 是否会产生  $\alpha$ -银环蛇毒素同工毒素功能的分化? 都缺乏足够的了解。近年本实验室从银环蛇毒腺克隆到一种新的  $\alpha$ -银环蛇毒素同工毒素 (P22-A31) 基因 (汪芳、王义权, 2005), 现在在此基础上用这种新的同工毒素基因进一步表达和纯化, 并比较新的同工毒素与已知天然  $\alpha$ -银环蛇毒素抗原性、毒性和镇痛作用等进行了初步研究, 为研究  $\alpha$ -银环蛇毒素基因多态性存在的机制、利用  $\alpha$ -银环蛇毒素开发新药打下一定的基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

pGEX-BgTX (P22-A31) 质粒 和大肠杆菌 BL21 (DE3) 为本实验室保存; 试验用昆明系小鼠由厦门大学抗癌中心提供; 丙烯酰胺、N, N-甲叉双丙烯酰胺、甘氨酸、考马斯亮兰 R250、还原

型谷胱甘肽均为 Amresco 产品; 蛋白标准物为 NEB 产品; 预染蛋白标准物为 Fermentas MBI 产品; Protein A-agarose 和谷胱甘肽 Sepharose FF 为 Amersham Pharmacia 产品; 辣根过氧化物酶 (HRP)、碱性磷酸酶 (AP) 分别标记的羊抗小鼠 IgG、凝血酶、福氏完全佐剂、福氏不完全佐剂均购自 Sigma 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 表达和纯化重组  $\alpha$ -银环蛇毒素** 将载有 pGEX-BgTX (P22-A31) 质粒的大肠杆菌 BL21 (DE3) 单克隆菌落于 20 ml 含有终浓度为 100  $\mu$ g/ml 氨苄的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 然后将菌液加入 200 ml 同样的培养基中, 放大培养至 OD<sub>600</sub> 值达到 0.5 - 0.7 时, 加入 IPTG (异丙基-D-硫代半乳糖苷) 至终浓度为 0.2 mmol/L, 于 28 $^{\circ}$ C 诱导培养 4 h。诱导培养后的菌液于 5 000 g 离心 5 min 收集细菌, 再用预冷的 PBS (140 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3) 漂洗细菌两次, 最后用 8 ml 冰浴的 PBS 悬浮细菌。在功率 100 W 下, 超声破碎细菌 20 次 (每次 4 s, 间歇 8 s), 12 000 g 离心 10 min, 上清加入预先用 10 倍体积 PBS 平衡过的谷胱甘肽 Sepharose FF 柱 (1 ml) 中, 于 4 $^{\circ}$ C 轻摇 1 h 后, 用大约 50 ml PBS 冲洗柱床, 流速约为 0.5 ml/min, 直至流出液的 OD<sub>280</sub> 值趋于 0。然后向柱床中加入 2 ml 含有 20 U 凝血酶的凝血酶切割缓冲液 (50 mmol/L Tris pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 0.1%  $\beta$ -巯基乙醇, 22 $^{\circ}$ C 轻摇 8 h, 收集柱中液体于 -70 $^{\circ}$ C 保存。

**1.2.2 蛋白浓度测定** 以牛血清白蛋白 (BSA) 为标准, 按照 Bradford (1976) 方法绘制标准曲线, 再根据检测样品的 OD<sub>595</sub> 值, 确定样品蛋白浓度。

**1.2.3 多克隆抗体的制备** 选取 10 只 10 周龄左右的 BALB/c 雌鼠。取重组  $\alpha$ -银环蛇毒素 2 ml (浓度为 1 mg/ml), 加入 2 ml 弗氏完全佐剂 (后三次用不完全佐剂), 在振荡器上混合至抗原完全乳化。皮下注射小鼠, 共 4 次, 每次间隔 10 d。每只小鼠取 4 点 (后腿两点, 背部两点) 注射, 每点注射抗原乳剂 0.1 ml。最后一次注射后第 3 d, 将小白鼠的尾巴剪断采血数滴, 进行 ELISA 反应, 以检查抗体的产生情况, 若呈阳性, 而且颜色较深, 则符合要求。最后一次注射后第 4 d 采血。剪去小白鼠的一只眼睛, 收集鼠血。室温下使血液凝固, 待血液凝固后, 用移液器吸头沿管壁剥离血块, 置室温

2 - 3 h, 再置于 4 °C 冰箱过夜。4 × 2 000 g 离心 10 min, 取血清, 分装成小管置于 - 70 °C 冰箱保存。

**1.2.4 多克隆抗体的纯化** 将一只免疫过的小鼠的血清加入约 1 ml protein A-agarose 柱 (0.1 mol/L Tris-HCl, pH 8.0, 10 倍柱床体积平衡) 中, 4 °C 结合 1 h 后用 10 倍柱床体积的 0.01 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 洗柱, 再用 5 倍柱床体积的 0.1 mol/L 甘氨酸 (pH 3.0) 洗脱, 收集洗脱液每管 0.5 ml, 并在每管中加入 50 μl 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)。以洗脱液为对照, 测定每个收集管中液体的 OD<sub>280</sub> 值, 将所测值最高的两管混合, 分装成小份, - 70 °C 保存, 用于 ELISA 和 Western 杂交。

**1.2.5 酶联免疫分析** 酶标板中每孔加入 50 μl 浓度为 20 μg/ml 的重组  $\alpha$ -银环蛇毒素溶液和天然  $\alpha$ -银环蛇毒素溶液, 置湿盒中, 37 °C 温育 2 h。用 PBS 洗涤滴定板 2 次, 然后在吸水纸上轻轻扣干, 用封阻液加满孔, 于湿盒中 37 °C 1 h, 再用 PBS 洗涤滴定板 2 次。每孔加 50 μl 不同稀释度用封阻液 (140 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3, 0.2% Tween-20) 稀释的抗体溶液, 在湿盒 37 °C 温 1.5 h, 然后 PBS 洗涤滴定板 4 次。每孔加入用封阻液按 1:2 500 稀释过的 HRP 标记的羊抗 IgG 50 μl, 于湿盒中 37 °C 温育 1.5 h, 用 PBS 再次洗滴定板 4 次。每孔加入 50 μl 现配的底物溶液显色至深度适宜后 (一般 5 - 30 min), 再加入 50 μl 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应, 蓝色阳性变成亮黄色, 稳定 3 - 5 min 在酶标仪中读取 OD<sub>450</sub> 值。

**1.2.6 Western 杂交** 用 5 μl 预染蛋白分子量标准, 10 μl (100 ng/μl) 天然  $\alpha$ -银环蛇毒素纯品 (Sigma), 10 μl (100 ng/μl) 重组  $\alpha$ -银环蛇毒素进行 SDS-PAGE 电泳后, 在电解缓冲液 (480 mmol/L Tris HCl, 390 mmol/L 甘氨酸, 0.37% SDS) 中转膜, 70 V, 70 min 后取出尼龙膜, 置封闭液 (140 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3, 1% 脱脂奶粉) 中, 室温轻摇 2 h。加入用封闭液稀释的抗  $\alpha$ -银环蛇毒素多抗, 4 °C 轻摇 2 h。用 PBS 漂洗 3 次, 每次 10 min。加入用二抗缓冲液稀释的 Anti-IgG AP, 室温轻摇 1 h。再用二抗缓冲液漂洗 4 次, 每次 10 min。加入底物溶液, 显色至出现颜色深度适宜的条带。

**1.2.7 重组蛋白毒性检测** 检测按 Meier and Theakston (1986) 的方法, 取 18 - 20 g 昆明种雄

性小白鼠共 16 只。其中 10 只分别通过尾静脉注射 0.5 ml 不同浓度的重组神经毒素溶液, 每种浓度注射 2 只小鼠; 2 只分别注射约 1 mg/ml 的融合蛋白, 2 只分别注射加入相同剂量凝血酶的凝血酶切割缓冲液和 2 只分别注射溶于 PBS 中的 GST 蛋白作为阴性对照。在注射后的 2 - 60 min 内记录小鼠死亡情况并记录存活时间。以每 kg 体重的剂量/存活时间 (D/T) 为横坐标, 以小鼠的每 kg 体重的注射剂量为纵坐标作图线性回归, 曲线与纵坐标的交点为无限时间内杀死 50% 的实验动物的剂量, 即 LD<sub>50</sub>。

**1.2.8 重组蛋白镇痛效果的检测** 按照 Koster et al. (1959) 和 Teber et al. (1969) 方法, 选取健康昆明系雄性小鼠 15 只, 体重 20 ± 2 g, 随机分组, 每组 5 只, 腹腔注射不同剂量重组神经毒素 0.4 ml, 其中一组为阴性对照, 腹腔注射凝血酶切割缓冲液 0.4 ml, 注射 1 h 后每只小鼠腹腔注射 0.6% 冰醋酸 0.2 ml。记录注射致痛剂后 20 min 内各鼠扭体次数, 以腹部和后肢因刺激而伸展一次定义为一次扭体反应。采用摄像机拍摄后, 一人多次计数的方式以避免主观误差。比较组间差异, 然后计算药物镇痛百分率。药物镇痛百分率 = (空白组平均扭体次数 - 对照组平均扭体次数) / 空白组平均扭体次数。

## 2 结 果

### 2.1 重组 $\alpha$ -银环蛇毒素的表达和纯化

常用表达载体 pGEX 表达出的可溶性 GST- $\alpha$ -银环蛇毒素融合蛋白约占菌体总蛋白的 25%。表达后的融合蛋白经谷胱甘肽 Sepharose FF 纯化, 凝血酶柱上酶切后得到的重组  $\alpha$ -银环蛇毒素在 N 端比天然  $\alpha$ -银环蛇毒素多出了一个甘氨酸和一个丝氨酸, 15% 的 SDS-PAGE 电泳检测 (图 1) 可知得到较多的分子量在 8 kD 左右的蛋白, 但也有少量 GST 蛋白被洗脱下来。用 Bradford 方法定量蛋白可知, 融合蛋白得率为 14.0 mg/L; 重组  $\alpha$ -银环蛇毒素得率为 1.225 mg/L。

### 2.2 $\alpha$ -银环蛇毒素抗原性的检测

重组  $\alpha$ -银环蛇毒素抗体分别稀释 50、100、200、500、1 000、2 000、5 000、10 000 倍, 用 PBS 作阴性对照, 以重组  $\alpha$ -银环蛇毒素作为阳性对照, 检测天然  $\alpha$ -银环蛇毒素的抗原性, 同时检测制备抗体的效价。结果可知, 用重组  $\alpha$ -银环蛇毒素抗体可以检测天然  $\alpha$ -银环蛇毒素, 说明重组  $\alpha$ -银环蛇毒素与天然  $\alpha$ -银环蛇毒素有相同的抗原性, 制备的

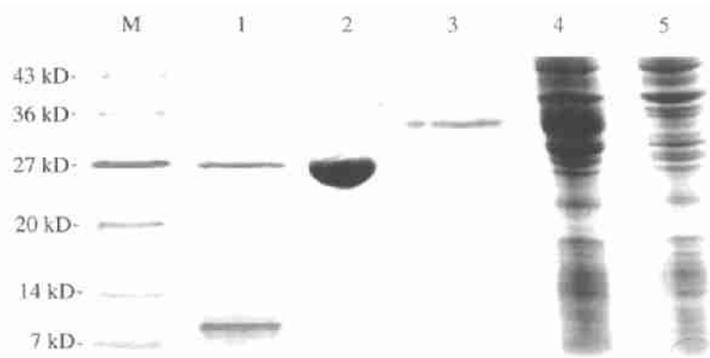


图 1 谷胱甘肽 Sepharose FF 纯化、凝血酶柱上酶切后收集的重组蛋白 SDS-PAGE 电泳

M: 蛋白标准。1: 纯化后的重组蛋白。2: GST 蛋白。3: 纯化的重组 GST- $\alpha$ -银环蛇毒素融合蛋白。4: 诱导后菌液上清。5: 未诱导菌液上清。

Fig. 1 The result of SDS-PAGE electrophoresis of recombinant  $\alpha$ -bungarotoxin after purified in glutathione sepharose FF affinity column and cleaved by thrombin

M: Protein Marker. 1: Purified recombinant  $\alpha$ -bungarotoxin. 2: GST protein. 3: Purified GST- $\alpha$ -bungarotoxin fusion protein. 4: Supernatant of induced product. 5: Supernatant without induction.

重组  $\alpha$ -银环蛇毒素的抗体效价为 1 200。

用 100 倍稀释的重组  $\alpha$ -银环蛇毒素抗体做 Western 杂交, 结果如图 2 所示, 重组  $\alpha$ -银环蛇毒素和天然  $\alpha$ -银环蛇毒素在相同分子量的位置有杂交的条带出现, 进一步说明了重组  $\alpha$ -银环蛇毒素与天然  $\alpha$ -银环蛇毒素有相同的抗原性。

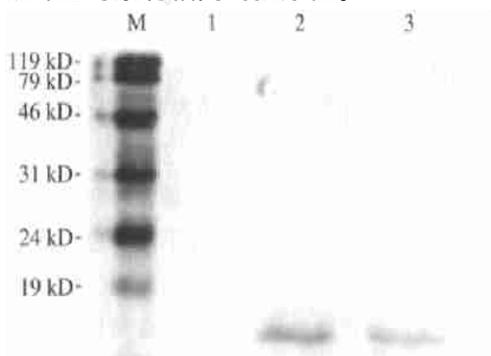


图 2 天然和重组  $\alpha$ -银环蛇毒素与  $\alpha$ -银环蛇毒素多克隆抗体的 Western 杂交

M: 预染蛋白标准。1: 阴性对照。2: 天然  $\alpha$ -银环蛇毒素。3: 重组  $\alpha$ -银环蛇毒素。

Fig. 2 Western blot using natural and recombinant  $\alpha$ -bungarotoxin to hybridize with alpha-bungarotoxin multi-clone antibody

M: Prestained protein marker. 1: Negative control. 2: Natural  $\alpha$ -bungarotoxin. 3: Recombination  $\alpha$ -bungarotoxin.

### 2.3 重组 $\alpha$ -银环蛇毒素的毒性试验

10 只尾静脉注射不同剂量的重组  $\alpha$ -银环蛇毒素的小鼠, 其中有 5 只死亡, 呈明显的神经毒素中毒的症状。死亡前小鼠四肢抽搐、竖毛、行动迟

缓; 未死亡的小鼠也在不同程度上出现竖毛、行动迟缓。小鼠的死亡时间随注射剂量的增加而缩短(表 1)。阴性对照组小鼠仅在刚注射凝血酶切割缓冲液时表现出一定的异常, 可能是由于凝血酶切割缓冲液对小鼠有一定的刺激作用, 几分钟后恢复正常状态, 注射 GST 蛋白的对照组小鼠无异常表现, 而注射 1 mg/ml 融合蛋白的小鼠未出现神经中毒症状。以小鼠 kg 体重的剂量/存活时间 (D/T) 与每 kg 体重的注射剂量的对应关系如图 3, 重组神经毒素的 LD<sub>50</sub> 值为 1.598 mg/kg。

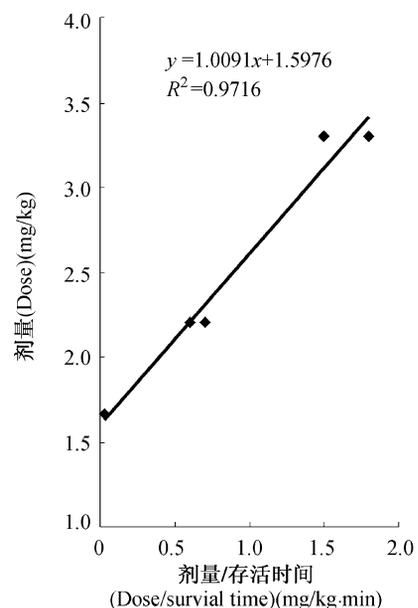


图 3 重组  $\alpha$ -银环蛇毒素 LD<sub>50</sub> 的测定

Fig. 3 LD<sub>50</sub> determination of recombinant  $\alpha$ -bungarotoxin

表 1 重组 -银环蛇毒素体内毒性试验

Table 1 The in vivo toxicity of the recombinant -bungarotoxin

组别 Groups	切割缓冲液 + 凝血酶 (U/ kg)	GST + PBS (mg/ kg)	融合蛋白 (mg/ kg)	重组 -银环蛇毒素 (mg/ kg)				
	Cleavage buffer + thrombin (U/ kg)		Fusion protein (mg/ kg)	Recombinant -bungarotoxin (mg/ kg)				
剂量 Doses	250	2	25	0.440	0.880	1.665	2.200	3.300
死亡数 Death numbers	0	0	0	0	0	1	2	2
死亡时间 (min) Death time (min)						60	3.6/3.1	2.2/1.8

## 2.4 重组 -银环蛇毒素的外周镇痛试验

计数小鼠受到化学刺激后 20 min 内的扭体次数, 结果如表 2 所示。腹腔注射不同剂量重组神经毒素的小鼠与注射凝血酶缓冲液的对照组相比, 在不同程度上扭体次数有所减少。其中注射 1/8 LD<sub>50</sub> 剂量组小鼠平均扭体次数约为 37 次, 计算得在此剂量下的镇痛百分率为 20.4%; 注射 1/4 LD<sub>50</sub> 剂量组小鼠平均扭体次数约为 29 次, 计算得在此剂量下的镇痛百分率为 55.2%。说明本文原核表达的重组 -银环蛇毒素具有一定的外周镇痛效果, 且镇痛效果随着注射重组 -银环蛇毒素剂量的增加而增加。

表 2 不同剂量的重组 -银环蛇毒素对小鼠的镇痛试验结果

Table 2 Analgesic effects of recombinant -bungarotoxin with different doses in mice

组别 Groups	空白组 Control group	1/8 LD <sub>50</sub> (199.8 μg/ kg)	1/4 LD <sub>50</sub> (399.5 μg/ kg)
扭体次数 Stretching times	58.8 ±11.9	36.8 ±9.8	29.2 ±13.1
镇痛百分率 Percentage analgesia	0	20.4 %	55.2 %

## 3 讨论

用亲和纯化、柱上酶切的纯化方法得到的重组 -银环蛇毒素中含有少量的 GST 蛋白, 可能是由于切割过程中凝血酶的最适切割条件 (pH 8.0) 与 GST 蛋白结合到谷胱甘肽 Sepharose FF 凝胶的结合条件 (pH 7.3) 有些差距, 故在柱上切割后收集蛋白中可以检测到未结合的 GST 蛋白, 但尝试用 PBS 作为切割缓冲液, 由于其切割效率较低而未被采用。若要得到更纯的重组 -银环蛇毒素可

以用 Sephadex G50 分子筛进一步纯化, 也可以用谷胱甘肽 Sepharose FF 凝胶重结合法除去少量的 GST 杂质, 研究中也尝试了用这种方法, 但仍没有将 GST 蛋白完全除去, 还在一定程度上造成重组 -银环蛇毒素的降解。由结果可知融合蛋白的得率为 14 mg/L, 表示其中含重组 -银环蛇毒素部分为 3.3 mg/L, 而经过酶切后仅得到 1.225 mg/L 的重组 -银环蛇毒素, 说明在酶切过程中有相当一部分重组 -银环蛇毒素丢失或降解。如何更高效、经济地表达重组 -银环蛇毒素将有待继续深入研究。

研究所得重组 -银环蛇毒素的毒性仅为天然 -银环蛇毒素的 1/5 (天然 -银环蛇毒素的 LD<sub>50</sub> 值为 0.3 mg/ kg, <http://au.expsasy.org/cgi-bin/nic-eprot.pl?P60615>)。同样情况也见于其它神经毒素表达的研究中 (钱友存等, 2000a, b), 这可能是因为该活性蛋白未经复性处理, 存在部分蛋白空间构象不完全正确而导致活性下降, 也可能是在表达纯化的过程中一些试剂处理的影响, 使部分蛋白构象改变而导致毒性降低。经凝血酶切割后得到的重组 -银环蛇毒素同工毒素虽然在 N 端比天然 -银环蛇毒素多出 2 个氨基酸, 但这种情况通常不会对蛋白构象产生大的影响, 从而降低毒性。我们曾用未经酶切的融合蛋白做毒性试验, 发现没有切除 GST 的融合蛋白没有毒性, 即便在静脉注射大量融合蛋白后不能使小鼠出现神经中毒现象, 这可能由于 -银环蛇毒素是一个分子量较小的蛋白, 与 GST 形成融合蛋白后, 其功能域可能被包裹起来, 从而无法发挥其生物学功能。

重组 -银环蛇毒素的镇痛试验表明, 该重组蛋白具有一定的镇痛作用, 且镇痛效果与注射剂量在一定范围内成正比, 这种量效一致的现象在平颌海蛇重组长链神经毒素的化学镇痛作用研究中也发现

过(钟肖芬)。有研究表明神经毒素的镇痛机制可能与中枢 M 型胆碱系统有关(陈汝筑、吴秀荣, 1988a), 也有研究认为眼镜蛇神经毒素的镇痛机理可能涉及到中枢内源性阿片肽能系统的活动(陈汝筑、吴秀荣, 1988b), 但神经毒素的镇痛机制还没有定论, 通过基因工程手段得到的  $\alpha$ -银环蛇毒素为深入研究其镇痛机理提供了方便。

蛇毒成分复杂, 含有多种生物活性物质, 仅  $\alpha$ -银环蛇毒素就发现了几种同工毒素(Liu et al., 1998), 同工毒素在组成上往往只有很小的差异, 它们的氨基酸序列和空间构象十分相似, 同一个体内同工毒素的存在, 对蛇本身可能有其生物学意义(汪芳、王义权, 2005), 获取不同的同工毒素, 在研究毒素与受体的相互作用机制和药物研发中具有非常重要的意义。本研究表达的重组  $\alpha$ -银环蛇毒素与天然  $\alpha$ -银环蛇毒素在 22 位氨基酸上不同(Leu Pro), 这一个氨基酸的突变可能使重组  $\alpha$ -银环蛇毒素空间构象有所变化从而导致其活性的改变。钱友存等(2000b)从银环蛇毒腺 cDNA 中克隆到的  $\alpha$ -银环蛇毒素(V31)原核表达、纯化后的重组  $\alpha$ -银环蛇毒素毒性为天然的 1/6。段海清等人(1998, 1999)用序列合成拼接的方法克隆到  $\alpha$ -银环蛇毒素(A31)基因, 原核表达并纯化后, 毒性实验证明原核表达的重组  $\alpha$ -银环蛇毒素(A31)与他们分离纯化的天然  $\alpha$ -银环蛇毒素毒性相当。本研究表达的重组  $\alpha$ -银环蛇毒素(P22-A31)毒性较低究竟是由于是不同的同工毒素还是如上所述的原因还需进一步的研究, 这一基因的克隆、表达和活性研究, 为进一步克隆  $\alpha$ -银环蛇毒素的其它同工毒素, 比较不同变体结构与功能的关系, 打下一定的基础; 也为改造  $\alpha$ -银环蛇毒素基因, 用表达重组  $\alpha$ -银环蛇毒素不同变体为研究乙酰胆碱受体提供更加有效的探针。

## 参考文献 (References)

- Bradford MM, 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 7 (72): 248 - 254.
- Chen RZ, Robiso SE, 1990. The effect of cholinergic manipulation on the analgesic response to cobrotoxin in mice. *Life Sci.* 47 (21): 1 949 - 1 954.
- Chen RZ, Wu XR, 1988a. The analgesis effect of neurotoxin from Chinese cobra. *Chinese Pharmacological Bulletin* 4 (2): 113 - 116 (In Chinese).
- Chen RZ, Wu XR, 1988b. Analgesis effect of neurotoxin from Chinese cobra in relation to different medicine. *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology* 2 (1): 1 - 5 (In Chinese).
- Chen YC, Yuan SL, 1988. Studies and Applications on Toxins. Beijing: Science Press, 27 - 126 (In Chinese).
- Clark DG, Macmurchie DD, Elliott E, Wolcott RG, Landel AM, Raftery MA, 1972. Elapid neurotoxins, purification: characterization, and immuno-chemical studies of  $\alpha$ -bungarotoxin. *Biochem.* 11 (9): 1 663 - 1 669.
- Duan HQ, Zhang ZS, Li SQ, Huan CF, 1998. Cloning and expression of  $\alpha$ -bungarotoxin gene. *Letters in Biotechnology* 9 (4): 247 - 252 (In Chinese).
- Duan HQ, Zhang ZS, Li SQ, Huan CF, 1999. Purification and biological activity of the recombinant  $\alpha$ -bungarotoxin. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 15 (5): 747 - 751 (In Chinese).
- Liu LF, Chang CC, Lian MY, Kuo KW, 1998. Genetic characterization of the mRNA encoding  $\alpha$ -bungarotoxin: isoforms and RNA editing in *Bungarus multicinctus* gland cells. *Nucleic Acids Res.* 26 (24): 5 624 - 5 629.
- Koster R, Anderson M, de Beer EJ, 1959. Acetic acid for analgesic screening. *Fed. Proc.* 18: 412.
- Meier J, Theakston RD, 1986. Approximate LD<sub>50</sub> determinations of snake venoms using eight to ten experimental animals. *Toxicol* 24 (4): 395 - 401.
- Qian YC, Shen Y, Fan CY, Hu TS, Yang SL, Gong Y, 2000a. Expression and characterization of two kinds of recombinant snake neurotoxins. *Chinese Journal of Biotechnology* 16 (3): 312 - 315 (In Chinese).
- Qian YC, Shen Y, Fan CY, Hu TS, Yang SL, Gong Y, 2000b. Molecular cloning and functional expression of  $\alpha$ -bungarotoxin (V31) from Chinese Continental banded krait. *Zool. Res.* 21 (1): 41 - 47 (In Chinese).
- Qin GP, 1998. China Poisonous Snake Research. Guangxi: Guangxi Science & Technology Publishing House, 495 - 496 (In Chinese).
- Pu XC, Wong PT, Gopalakrishnakone P, 1995. A novel analgesic toxin (hannalgesin) from the venom of king cobra *Ophiophagus hannah*. *Toxicol* 33 (11): 1 425 - 1 431.
- Rosenthal JA, Hsu SH, Schneider D, Gentile LN, Messier NJ, Vaslet CA, Hawrot E, 1994. Functional expression and site-directed mutagenesis of a synthetic gene for  $\alpha$ -bungarotoxin. *J. Biol. Chem.* 269 (16): 11 178 - 11 185.
- Samson A, Scherf T, Eisenstein M, Chill J, Anglister J, 2000. The mechanism for acetylcholine receptor inhibition by alpha-neurotoxins and species-specific resistance to alpha-bungarotoxin revealed by NMR. *Neuron* 35 (2): 319 - 332.
- Scarselli M, Spiga O, Ciutti A, Bernini A, Bracci L, Lelli B, Lozzi L, Calamandrei D, Maro DD, Klein S, Nicolai N, 2002. NMR structure of alpha-bungarotoxin free and bound to a mimotope of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochem.* 41 (5): 1 457 - 1 463.
- Teber RI, Greenhouse DD, Rendell JK, Irwin S, 1969. Agonist and antagonist interactions of opioids on acetic acid-induced abdominal stretching in mice. *J. Pharm. Exp. Ther.* 169 (1): 29 - 38.
- Wang F, Wang YQ, 2005. Molecular cloning and expression of and isotoxin gene,  $\alpha$ -bungarotoxin. *Acta Genetica Sinica* 32 (7): 682 - 688 (In Chinese).
- Yang L, Li H, Wu YX., Guo L, Li ZP, Zhang YZ, Pan CZ, Liu YL, Wang WY, 1995. Curative effect observation of  $\alpha$ -cobrotoxin capsule. *Yunnan Medication* 16 (1): 42 - 44 (In Chinese).
- Zeng H, Moise L, Grant MA, Hawrot E, 2001. The solution structure of the complex formed between  $\alpha$ -bungarotoxin and an 18-mer cognate peptide derived from the 1 subunit of the nicotinic acetyl-

钟肖芬, 2002. 平颞海蛇神经毒素的重组表达、纯化及功能研究. 中山大学博士论文, 68 - 69 [Zhong XF, 2002. Study on the recombinant expression, purification and function of neurotoxins from *Lapemis hardwickii*. Doctoral Thesis, Zhongshan University 68 - 69 (In Chinese)]

- choline receptor from *Torpedo Californica*. J. Biol. Chem. 276 (25): 22 930 - 22 940.
- 陈汝筑, 吴秀荣, 1988a. 眼镜蛇神经毒素的镇痛作用. 中国药理学通报 4 (2): 113 - 116.
- 陈汝筑, 吴秀荣, 1988b. 不同药物对眼镜蛇神经毒素镇痛效应的影响. 中国药理学与毒理学杂志 2 (1): 1 - 5.
- 陈远聪, 袁士龙, 1988. 毒素的研究和利用. 北京: 科学出版社, 27 - 126.
- 段清海, 张兆山, 李淑琴, 黄翠芬, 1998.  $\alpha$ -银环蛇毒素的克隆和表达. 生物技术通讯 9 (4): 247 - 252.
- 段清海, 张兆山, 李淑琴, 黄翠芬, 1999.  $\alpha$ -银环蛇毒素基因的合成和表达. 生物化学与生物物理学报 31 (3): 254 - 258.
- 钱友存, 沈雁, 范春阳, 胡太山, 杨胜利, 龚毅, 2000a. 蛇毒神经毒素的表达和鉴定. 生物工程学报 16 (3): 312 - 315.
- 钱友存, 沈雁, 范春阳, 胡太山, 杨胜利, 龚毅, 2000b. 银环蛇神经毒素的分子克隆和功能表达. 动物学研究 21 (1): 41 - 47.
- 覃公平, 1998. 中国毒蛇学. 广西: 广西科学技术出版社, 495 - 496.
- 汪芳, 王义权, 2005.  $\alpha$ -银环蛇毒素同工毒素基因的克隆和表达. 遗传学报 32 (7): 682 - 688.
- 杨良, 李红, 吴亚雄, 郭玲, 李志平, 张玉祖, 潘常忠, 刘友祥, 熊郁良, 王婉瑜, 1995. 蛇毒胶囊治疗海洛因成瘾临床疗效观察. 云南医药 16 (1): 42 - 44.

www.cnki.net