【研究简报】

BmK AS, 一种新型骨骼肌 Ryanodine 受体激动肽的氨基酸序列

吉永华^① 刘 艳^① 徐 科^① 大石崇秀^②望月澈^② 星野捻^② 矢内原升^③

(①中国科学院上海生理研究所, 上海 200031; ②日本静冈县立大学药学部, 静冈 422, 日本;

③日本矢内原研究所, 富士宫, 日本 418)

关键词 东亚钳蝎 Ryanodine 受体激动肽 一级结构

前文^[1]曾报道从东亚钳蝎毒中纯化了一个新型骨骼肌 Ryanodine 受体激动肽(BmK AS)。本工作将进一步报道该活性肽的完整氨基酸序列。由它的序列(共 66 个残基)计算出的最小分子量为 7 698 u 与经电喷雾质子光谱测定的 7 696.26 u 值基本吻合。其分子结构与同一蝎毒中已知的各类 Na⁺ 通道配体间的同源性较差。但与一种独特的非洲蝎所产抗昆虫毒素(AaH IT), 同属 Na⁺ 通道配体间却存在着 >80% 的相似性^[2]。

1 材料与方法

BamK AS 的纯化参照文献[1]进行。分别用 SDS-PAGE 电泳法和电喷雾质子光谱仪鉴定纯化样品的纯度和分子量。

残基缺失影响纤溶酶对 scu-PA 的转换, 取得较为理想的结果。

致谢 本工作为国家“八六三”高技术发展计划资助项目。

参 考 文 献

- 1 Wrinkle M E, Blaber M, Bennett G L. Purification and characterization of recombinant single-chain urokinase product in *Escherichia Coli*. *Biochemistry*, 1986, 25: 4 041~4 050
- 2 Liu J N, Gurewich V. The kinetics of plasminogen activation by thrombin-cleaved pro-urokinase and promotion of its activity by fibrin fragment E-2 and by tissue plasminogen activator. *Blood*, 1993, 81: 980
- 3 John R C, Marshall S R, Gery M, et al. A bispecific antibody enhances the fibrinolytic potency of single-chain urokinase. *Biochem*, 1990, 27: 6 374
- 4 Rampling M W, Gaffney P J. The sulfite precipitation method for fibrinogen measurement: its use on small samples in the presence of fibrinogen degradation products. *Clin Chim Acta*, 1976, 678: 43
- 5 Ploug J, Kjeldgaard N O. Urokinase, activator of plasminogen from human urine: (I) isolation and properties. *Biochem Biophys Acta*, 1957, 94(24): 278~282
- 6 Valery N, Leonid M H, Roger L, et al. Tissue-type plasminogen activator (tPA) interacts with urokinase-type plasminogen (uPA) via tPA's lysine binding site. *J Biol Chem*, 1995, 270: 8 680

(1996-04-01 收稿, 1996-09-19 收修改稿)

取 50 nmol (约 400 μg) 的 BmK AS 多肽样品溶解在 0.5 mL 的 0.25 mol/L Tris-醋酸缓冲液 (pH 8.6, 内含 5 mol/L 盐酸胍和 14 mmol/L 的 EDTA) 中, 加入 40 mmol/L (3 mg) DTT 后用锡箔纸包裹样品反应管, 并将其放入 40 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中保温 20 h, 再向反应管中加入 40 $\mu\text{mol/L}$ (8 mg) 碘乙酸钠, 黑暗条件下室温放置 30 min. 将反应液移入一 Centricon-3 过滤离心管 (Molecular weight cut-off 3 ku, 美国 Amicon 公司) 中, 经 3 500 r/min 离心 10 h, 去除反应液中的小分子和盐份物质. 分别用 500 μL 的 50% (V/V) 和 60% (V/V) 醋酸溶液洗脱保留在离心管膜上的反应样品. 收集的洗脱液经冰冻真空干燥为被还原和羧甲基化处理的 BmK AS (RCM-BmK AS).

取约 25 nmol 的 RCM-BmK AS 溶解在 250 mL 的 0.2 mol/L N-Methylmorpholin 缓冲液 (pH 8.1) 中, 加入约 10 μg 的 *S. aureus* V₈ 蛋白酶 (美国 Miles 公司产品), 将其放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中保温 24 h 后, 再加入约 5 μL 的 1 mol/L 盐酸 止酶解反应, 并随即保存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 中待分离.

取约 10 nmol 的 RCM-BmK AS 酶解液直接注入 HPLC 系统 (美国 Applied Biosystems 公司蛋白和多肽分离系统, 型号 150A, 由 1 台 1480A 型进样混合仪, 2 台 1400A 型溶剂输送器和 1 台 1783A 光学检测及梯度控制仪组成) 中. HPLC 分离柱为 YMC-Pack R-ODS-5 (4.6 mm $\times$ 250 mm, 120 $\text{\AA}$). 分离是在线性乙腈梯度洗脱条件下进行的. 起始浓度: 95% 的 0.01 mol/L 盐酸/5% 的乙腈, 至 55 min 时为 40% 的 0.01 mol/L 盐酸/60% 的乙腈. 流速: 1 mL/min. 在 215 nm 检测多肽的吸收. AUFS 设置在 0.2. 用 1 台记录仪 (Ohkura Electric Co., Ltd., 东京) 记录洗脱的曲线.

天然 BmA AS 及 RCM-BmK AS 和酶解肽段氨基酸序列的测定均是在 477 A 蛋白质顺序仪 (美国 Applied Biosystems 公司) 上按 Edman 自动降解标准操作程序进行的.

2 结果

纯化获得的天然 BmK AS 多肽经电泳图谱鉴定为一条蛋白区带 (图谱未示), 其分子量经电喷雾质子光谱测定为 7 696.26 (如图 1 所示). 对该活性多肽自 N-末端至第 30 位的氨基酸序列测定 (除在第 12, 16, 23 和 27 位为 Cys 残基未能被确定外) 结果表明, 与前文报道的完全一致^[1]. 再对 RCM-BmK AS 进行的序列测定结果又将其序列延伸至第 57 位残基的确立. 经对图谱中 (图 2) 各酶解肽段肽段的 N-端若干残基序列鉴定后发现, 其中一个主要肽段成分 V₈-8 的 N-端 4 肽序列与上述测定的 RCM-BmK AS 第 54~57 位的序列相重叠吻合. 于是对 V₈-8 肽段重新进行了重点的序列测定. 结果表明, V₈-8 是由 13 个残基组成, 且是个位

图 1 BmK AS 的电喷雾质子光谱测定结果

于 BmK AS 多肽分子中第 54 至 C-末端第 66 位的肽段. 至此, BmK AS 多肽的完整氨基酸序列被测定确立 (见图 3). 据此计算出的 BmK AS 最小分子量为 7 698 u, 该数据与它的电喷雾质子光谱测定值 7 696.26 u 基本相对应一致.

图2 RCM-BmK AS的 *S. aureus* V₈ 酶解肽段的 HPLC 分离图谱

图3 BmK AS多肽完整氨基酸序列的测定

经序列结构比较分析发现, BmK AS 与同种蝎毒中已知的 α -抗哺乳动物神经毒素(BmK I 和 II) 和兴奋型抗昆虫毒素(BmK IT) 多肽间的同源性较差, 与抑制型抗昆虫毒素(BmK IT₂) 多肽间具有相对的同源性^{[3, 4]1)}, 但与一种非洲蝎 *A. australis* Hector 所产抗昆虫毒素多肽(AaH IT₁)^[2]间却存在着高度的相似性(见图 4)。

1) Ji Y H, Mansuelle P, Terakawa S, et al. Two neurotoxins (BmK I and BmK II) from the venom of the scorpion *Buthus martensi* Karsch: Purification, amino acid sequences and assessment of specific activity. *Toxicon*, in press

Toxins	1	10	20	30	40
BmK AS	. D	NGYLLDKYT	GC KVV CV I NN	ESCN SEC . K I R	GGYYGYCY
AaH IT ₄	. E	HGYLLNKYT	GC KVV CV I NN	EECGYLCNKR	R GGYGYCY
BmK IT ₂	. .	DGYI KGK .S	GC R VA CL I	GNQGCLKDC .	RAY GASYGYCW
BmK I	VR	DAYI . AKPHNC	VY E CAR N.	EYCNDL CTKDG .	AKSGYCQ
BmK II	VR	DAYI . AKPHNC	VY E CARN .	EYCNDLCTKD G .	AKSGYCQ
BmK IT	KK	NGYA . VDSS	GKV S E C LLN .	NYCNI NCTKV	YYATSGYCC
		50	60	70	Identity / %
BmK AS	F . . .	WK LAC FCQGAR	NS E . .	LW NYNT NK . .	CPNES . . 100
AaH IT ₄	F . . .	WK LACYCQGAR	KS E . .	LW NYKTNK . .	C . .DL . . 83
BmK IT ₂	T . . .	WG LACWCEGP	DNKT . . .	WKSES NT . .	CG 50
BmK I	WVGK	YNGCWC I EL P	DNVP I . R	VPGK	CH 36
BmK II	WVGKYG	NGCWC I EL P	DNVP I . R	IPGN	CH 36
BmK IT	L L S	CYCF GLDDDKA	VLK I KDAT	KSY CDVQHIN	33

图4 BmK AS多肽与相关蝎毒素多肽氨基酸序列的比较^{[3,4]1)}

3 讨论

Ryanodine受体是一种胞内Ca²⁺释放通道。它在一系列细胞活动,特别是在胞内信息传递等方面起着十分重要的调节作用。然而,Ryanodine作为探针用于探讨其受体的分子调控机理却存在着解离速度慢,在某种低浓度下呈激活,而在相对高浓度下却呈抑制受体的非线性效应曲线等缺陷。因而,从东亚钳蝎毒中发现的BmK AS多肽无疑为研究Ryanodine受体的分子调控机理提供了另一新型的工具。但是,最新的研究结果又揭示,BmK AS兼有增强去甲肾上腺素能神经递质释放及提高Na⁺电导的多重功能效应^[5]。那么阐明BmK AS的分子结构特征,进而探讨其结构与功能的关系尤显意义突出。如图4所示,BmK AS分子结构与同种蝎毒中已知的各类毒素多肽,如与BmK IT₂的同源性为50%,与BmK I和II的同源性约为36%,与BmK IT的同源性仅为33%,但与非洲蝎产抗昆虫毒素(AaH IT₄)的同源性却高达83%,明显的差异是BmK AS无论在N-或C-端都有一个与众不同的序列结构,且在C-末端又比AaH IT₄多2个残基,但在分子中却缺失了一个Asn₂₈中性残基。有趣的是,AaH IT₄已被描述为一个独特的Na⁺通道配体,它即与α-和β-抗哺乳动物蝎毒素,同时也与兴奋型抗昆虫蝎毒素在Na⁺通道上的结合位点均有着竞争结合反应。由此促使我们对新型BmK AS多肽的结构与功能以及药理特性做更深入的研究。

致谢 吴厚铭先生曾提供电喷雾质子光谱测定的协助,在此表示真诚的感谢。本工作为国家自然科学基金(批准号:39570235),中国科学院基础局(BS-05),中国科学院上海生命科学中心主任基金(940402)和上海市科学技术发展基金(95XD14002)资助项目。

参 考 文 献

- 1 吉永华,徐科,川野诚子,等. 一个新的增强Ryanodine与其在兔骨骼肌肌浆网受体结合的蝎毒素多肽. 科学通报, 1996,41(22):2077
- 2 Loret E P, Martin-Eauclaire M F, Mansuelle P, et al. An anti-insect toxin purified from the scorpion *Androctonus australis*

【研究简报】

腺病毒 E1 和 E4 区基因共存的细胞系的建立

王家旺 梁 箫 林 晨 张雪艳 吴 旻

(中国医学科学院中国协和医科大学肿瘤医院细胞生物室分子肿瘤学国家重点实验室,

ICSC-World Laboratory, 北京 100021)

关键词 腺病毒 腺辅助病毒 细胞系

腺病毒载体相对安全, 能有效地将外源基因转导到培养细胞或动物细胞中^[1], 但仍存在装载容量不够理想和免疫原性两个缺点. 尤其是后一缺点, 已成为制约其应用于临床基因治疗的主要因素^[2]. 据认为, E4 区基因在免疫原性中起着关键作用. 因此人们希望通过发展 E4 区和 E1a 共缺陷的腺病毒载体, 以降低或消除腺病毒载体免疫原性. 这首先需要建立 E4 和 E1 区共存的包装细胞系, 以互补腺病毒载体上 E4 和 E1 区功能的缺失, 完成腺病毒载体的复制和包装. 但有文献认为 E4 区和 E1a 不能稳定地存在于同一细胞中^[3]. 我们成功地将腺病毒的 E4 区 (pJM17 的 9724 bp EcoR I-Xba I 片段) 插入 AAV (Adeno-associated virus, 腺辅助病毒) 载体 pAAV/neo 中, 并转导进 293 细胞 (来自腺病毒 E1 区转化的人胚肾细胞, 含有 E1a 区) 中, 得到了 E1 和 E4 区稳定共存的 G418 抗性细胞系. 结果说明, E1 和 E4 区可以稳定地共存于同一细胞, 有可能建立无或低免疫原性, 外源基因装载量由 8 kb 扩大到 17 kb 的新一代腺病毒载体系统. 另外也表明, AAV 载体介导的外源基因大小至少可达 12 kb 左右 (E4 区 9.7 kb + neo 基因 2.7 kb = 12.4 kb).

1 材料与方法

(1) 转移载体的构建: 用 EcoR I 和 Xba I 酶切 pJM17, 回收 9 724 bp (腺病毒的 E4 区) 的片段. 用 EcoR I 和 Xba I 酶切 pAAV/neo, 分别回收载体和 neo 基因片段, 载体片段去磷酸化. 3 个片段于 16℃ 连接过夜后转化感受态 JM109 细胞. 感受态细胞制备参见文献[4].

(2) 细胞培养: 293 细胞和转染的细胞用高糖 DMEM 培养基 (补加 10% FBS 和 1% PS) 37℃ 培养于 CO₂ 培养箱中.

(3) 转染筛选: 用 Lipofectin 携带质粒 DNA 转染细胞. 用 800 μg/mL G418 筛选抗性细胞克隆 1 个月左右. 待阳性克隆出现后, 用无限稀释法, 在 96 孔板中筛选得到单克隆细胞系.

Hector also acts on the α - and β -sites of the mammalian sodium channel: sequence and circular dichroism study. Biochemistry, 1991, 30:633~640

3 Ji Y H, Mansuelle P, Xu K, et al. Amino acid sequence of an excitatory insect-selective toxin (BmK IT) from venom of the scorpion *Buthus martensi* Karsch. Science in China, Ser B, 1994, 37(1):42~49

4 Ji Y H, Terakawa S, Xu K. Primary structure of a depressant insect-selective toxin from venom of scorpion *Buthus martensi* Karsch. Chinese Science Bulletin, 1994, 39(11):945~949

5 黄华玉, 胡 谦, 周成文, 等. BmK AS 增加 Na⁺ 电导及 [³H] 去甲肾上腺素的释放. 见: 中国神经科学学会第一届学术会议论文摘要汇编. 上海: 中国神经科学学会, 1995. 49

(1996-04-01 收稿, 1996-06-21 收修改稿)