

东亚钳蝎 Na^+ 通道毒素 BmkNaTx12 的基因克隆与重组表达夏 扬^{1,2}, 胡玲玲^{1,2}, 陈 姣^{1,2}, 卢悟广^{1,2}, 颜怀江^{1,2}, 霍介格^{1,2}, 曹 鹏^{1,2*}(¹南京中医药大学附属省中西医结合医院, 南京 210023; ²江苏省中医药研究院细胞与分子生物实验室, 南京 210028)

摘 要 利用野生东亚钳蝎毒腺构建 cDNA 文库, 并通过序列比对确定了一条全新的 Na^+ 通道长链毒素 BmkNaTx12 并克隆出其全长 cDNA 序列。序列比对显示 BmkNaTx12 的序列与墨西哥毒蝎的 β -毒素 Cn12 具有较高的结构相似性, 通过同源模型构建并选取打分最高的模型得到 BmkNaTx12 的预测结构, 经分子动力学优化发现蛋白结构在 300 ns 趋于稳定, 而蛋白 20、35、52 个氨基酸处的波动很可能由于这些氨基酸所处位置在 loop 区域导致。进一步构建了 BmkNaTx12-Fc 融合蛋白重组表达系统, 通过 Western blot 技术确定重组蛋白最佳表达时间, 并在 HEK293 细胞中成功表达出 BmkNaTx12-Fc 融合蛋白。经蛋白 A 亲和色谱纯化后获得的重组融合蛋白经 SDS-PAGE 凝胶电泳及高效液相鉴定后纯度高达 95%。此外, 全细胞膜片钳实验结果显示: BmkNaTx12-Fc 在 $1 \mu\text{mol/L}$ 浓度下能增大 20% Nav1.7 峰电流。研究结果为后续的生物物理学功能研究奠定了理论基础。

关键词 东亚钳蝎; 蝎毒素; 基因克隆; 表达; Na^+ 通道

中图分类号 R931.74; R34; R966 **文献标志码** B **文章编号** 1000-5048(2017)02-0220-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170214

引用本文 夏扬, 胡玲玲, 陈姣, 等. 东亚钳蝎 Na^+ 通道毒素 BmkNaTx12 的基因克隆与重组表达[J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(2):220-226.

Cite this article as: XIA Yang, HU Lingling, CHEN Jiao, et al. Cloning and expression of recombinant BmkNaTx12, a new voltage-gated sodium channel from scorpion *Buthus martensii* Karsch[J]. J China Pharm Univ, 2017, 48(2):220-226.

Cloning and expression of recombinant BmkNaTx12, a new voltage-gated sodium channel from scorpion *Buthus martensii* Karsch

XIA Yang^{1,2}, HU Lingling^{1,2}, CHEN Jiao^{1,2}, LU Wuguang^{1,2}, YAN Huaijiang^{1,2}, HUO Jiege^{1,2}, CAO Peng^{1,2*}

¹Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023; ²Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

Abstract A cDNA library was constructed from glands of wild *Buthus martensii* Karsch scorpion. A new sodium channel long-chain toxin BmkNaTx12 was identified by sequence alignment, and its full-length cDNA sequence was cloned. Sequence alignment showed that the sequence of BmkNaTx12 had high structural similarity with the β -toxin Cn12 from Mexican *Centruroides noxius* scorpion. The predicted structure of BmkNaTx12 was obtained by homologous model construction and the highest scoring model was selected. The protein structure was found to be stable at 300 ns by molecular dynamics optimization, and fluctuations at amino acids 20, 35, and 52 are most likely due to the location of these amino acids in the loop region. Then, an expression system of recombinant BmkNaTx12-Fc fusion protein was constructed. The optimal expression time of recombinant protein was determined by Western blot and the fusion protein was successfully expressed in HEK293 cells. The purity of recombinant fusion protein which was obtained by protein A affinity chromatography was up to 95% by SDS-PAGE gel electrophoresis and HPLC. In addition, the whole-cell patch-clamp assay results suggest that $1 \mu\text{mol/L}$

收稿日期 2017-01-20 *** 通信作者** Tel: 025-85608666 E-mail: pciao79@yahoo.com

基金项目 2015 年度公益性行业科研专项经费项目 (No. 201507002); 国家自然科学基金资助项目 (No. 81622048, No. 81473377, No. 81573837); 江苏省自然科学基金资助项目 (No. BK20140049)

BmkNaTx12-Fc can increase 20% Nav1.7 peak current. These results laid a foundation for the further study of biological function.

Key words *Buthus martensii* Karsch; scorpion toxin; gene cloning; expression; Na⁺ channel

This study was supported by Quality Guarantee System of Chinese Herbal Medicines (No. 201507002); the National Natural Science Foundation of China (No. 81622048, No. 81473377, No. 81573837); and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province for Distinguished Young Scholars (No. BK20140049)

东亚钳蝎作为传统中医药用于脑卒中、癫痫、抽搐等疾病的治疗已经有几千年的历史^[1-2]。研究表明,蝎毒的活性物质主要是大量作用于 Na⁺、K⁺、Cl⁻、Ca²⁺等离子通道的毒素多肽。多数毒素多肽含有 3 对或 4 对二硫键,由 29~39 个氨基酸组成的主要作用于 K⁺通道或者 Cl⁻通道。作用于 Na⁺通道的长链毒素主要由 60~70 个氨基酸组成并含有 4 对二硫键。

电压门控 Na⁺通道在外周神经向中枢神经传递疼痛信号过程中扮演着关键角色,有研究表明,蝎毒中作用于钠通道的毒素是蝎毒致痛的主要原因^[1]。根据蝎毒在 Na⁺通道上电生理作用的差异将其分成 α 和 β 两类^[2]。 α 毒素的主要效应是延迟 Na⁺通道的失活,而 β 毒素则主要是通过上调激活电压从而影响 Na⁺通道的激活^[2]。

截至目前,从东亚钳蝎蝎毒中分离鉴定出来的毒素分子多肽超过 81 条,其中 α 毒素或者同源多肽达到 45 条^[3-8]。由于建立 cDNA 库的东亚钳蝎来源的养殖地与采收季节的差别,使得蝎毒腺中蛋白存在一定差异,从而为新毒素的发现提供了一定的研究条件。2014 年,梁鑫淼课题组利用东亚钳蝎蛋白质组数据进行分析,发现并鉴定出包括 BMKP2 在内的 6 个新的毒素分子^[5],这说明东亚钳蝎中依然存在新的毒素有待发掘及深入研究^[9],例如其作用的 Na⁺通道亚型、选择性、作用机制等方面的研究。由于天然蝎毒素含量非常少,常规分离纯化难度大能满足进行深入研究的需要,并且由于小分子蝎毒素多肽富含二硫键的结构特异性,常规多肽合成十分困难,给研究带来困难。因此克隆出蝎毒素的基因序列,并进行重组制备成为获得活性蝎毒多肽,提升其药用价值的重要选择。

当前有多个蝎毒素分别在哺乳动物细胞、酿酒酵母、大肠埃希菌中成功表达并且获得与天然毒素相近的活性。如 Bmk-M1、Bmk-AGAP、LqhLT2 等^[10-12]。因此,本课题组通过构建 cDNA 文库来

筛选具有功能活性的毒素序列,并通过重组的方式实现毒素蛋白的高表达,并研究其功能效应。

1 材 料

1.1 药品与试剂

东亚钳蝎(*Buthus martensii* Karsch, Bmk, 山东东亚钳蝎养殖场);东亚钳蝎 cDNA 文库和含连接于 pLIB 载体上 BmkNaTx12 基因的菌株(上海欧易生物医学科技有限公司构建);ptt5-FC 质粒载体、DH5 α 感受态细胞和 HEK293 细胞(本室保存);细胞培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司);Hind III 酶、Xba I 酶限制酶、DNA 连接酶和 DNA Mater(日本 TaKaRa 公司);酵母提取物和蛋白胨(英国 Oxoid 公司);PBO 酶、PCR 反应缓冲液、引物和质粒(南京金斯瑞生物科技有限公司);Western blot 用 FITC 标记的羊抗人 Fc 抗体(美国 LI-COR 公司);SMART cDNA 文库构建试剂盒;ClonExpress II 一步无缝克隆试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司);乙腈(色谱纯,美国 Tedia 公司);三氟乙酸(色谱纯,美国 Aladdin 公司);LipofectamineTM 2000 Reagent 转染试剂(北京索莱宝生物科技有限公司);其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪 器

PCR 仪(美国 AB 公司);AKTA 蛋白纯化系统、蛋白 A 亲和色谱柱(美国 GE 公司);落地式高速离心机(德国 Beckman Coulter 公司);Milli-Q Biocel 超纯水仪(美国 Millipore 公司);核酸电泳仪、蛋白电泳仪、凝胶成像系统 Gel Doc XR(美国 Bio-Rad 公司);Nanodrop 1000 紫外可见分光光度计(美国 Thermo 公司);高效液相色谱仪(美国 Waters 公司)。

2 方 法

2.1 东亚钳蝎尾腺 cDNA 文库构建

利用电针刺激东亚钳蝎蝎尾毒腺促使其排毒,48 h 后取下毒腺,冻存于液氮中。按 mirVanaTM

miRNA 分离试剂盒操作说明书提取总 RNA, 按 Advantage 2 聚合酶试剂盒操作说明从总 RNA 中提取并纯化 mRNA。按 SMART cDNA 文库构建试剂盒的操作要求反转录成 cDNA 第一链, 再利用 LD-PCR 合成双链 cDNA。产物经蛋白酶 K 消化后, 利用杂交和 DSN 消化使得文库均一化, 再通过两次 PCR 进行放大。利用 PCR 产物纯化试剂盒纯化扩增产物, 向得到的产物中加入 *Sfi* I 酶, 酶切完成后纯化酶切 cDNA。将 cDNA 与经改造的 PUC19 载体连接, 利用 DH5 α 感受态转化, 菌液均匀涂布于 Apr-IPTG/x-gal LB 固体培养基上, 37 °C 过夜。经 PCR 鉴定后保存菌液。该步骤交由上海欧易生物医学科技有限公司进行。

2.2 BmkNaTx12 序列分析与同源建模

序列分析及同源建模在 Discovery Studio 4.1 中完成。首先采用 Blast Search 模块在 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org>) 中搜寻 BmkNaTx12 的同源结构, 发现来自墨西哥毒蝎的 Cn12 毒素 (PDB ID: 1PE4) 与之同源性最高, identity 为 35%, 因此以 Cn12 的结构为模板模建 BmkNaTx12 的三维空间结构。首先使用 Align Sequence to Templates 模块对目标序列和模板序列进行比对, 然后使用 Build Homology Models 模块进行同源建模, 设置生成 4 对二硫键 (C12-C62, C16-C39, C25-C44, C29-C46)。选取打分最高的模型进行后续分子动力学优化。

2.3 BmkNaTx12 的分子动力学模拟

分子动力学模拟 (MD) 所用的软件为 Amber12, 硬件为 DELL T7610 工作站, 使用 K20c GPU 计算显卡。选用蛋白力场为 ff12SB。水分子的模型选用 TIP3P, 使用周期边界条件, 水盒子的大小为距离蛋白原子 10 Å。加入抗衡离子使体系的电荷为中性。为避免溶质与溶剂之间的碰撞, 在 MD 之前首先进行能量最小化 (分两步, 先固定蛋白对水分子进行 1 000 步的能量优化, 然后放开蛋白, 对整个体系进行 5 000 步优化)。继而使用 Langevin 算法 200 ps 内使体系温度升至 300 K, 步长为 1 fs, 非键阈值为 10.0 Å, 静电相互作用使用 particle-mesh Ewald 方法计算, 采用 SHAKE 算法约束氢键。每个体系在 NPT 系综下平衡 500 ps, 恒温 300 K, 恒压 1.0 atm。平衡之后, 使用 pmemd.cuda 进行 MD 模拟 500 ns, 步长为 2 fs。利用 ptraj 数据库进行 RMSD 和 RMSF 分析。

2.4 BmkNaTx12 重组表达载体构建

根据 BmkNaTx12 的序列设计引物: 正向 (FP-12): 5' ACTGGGGTCCACTCTTCTAGAACCAGAAATGGCTTTTTGTTG3', 含 *Xba* I 酶切位点 (单线); 反向引物 (RP-12): 5' ACCACCACCCTCGAGAAGCT-TATGAAATGTTTTGCATTTGACTCTA3', 含 *Hind* III 酶切位点 (单线)。以含有目的基因 BmkNaTx12 的 pLIB 载体 (cDNA 文库反馈) 为模板, 进行 PCR 反应, 条件为: 94 °C 5 min \rightarrow (94 °C 1 min, 56 °C 30 s, 72 °C 30 s) 30 个循环 \rightarrow 72 °C 5 min。选用本课题组改造的 pTT5-Fc 载体作为重组表达载体, 该载体为氨苄抗性, 并装载 *Xba* I 和 *Hind* III 酶切位点, 便于酶切鉴定和测序。pTT5-Fc 酶切反应体系: pTT5-Fc 载体质粒 20 μ L + M 缓冲液 5 μ L + *Xba* I 10 μ L + *Hind* III 10 μ L + ddH₂O 5 μ L, 在 37 °C 条件下反应 3 h, 对双酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳, 按照 DNA 快速回收试剂盒说明回收线性 pTT5-Fc 双酶切载体片段。利用 CloneExpress II 重组克隆试剂盒进行重组反应, 反应体系: BmkNaTx12 PCR 产物 4 μ L + pTT5-Fc 双酶切载体片段 20 μ L + 5 \times CE II buffer 4 μ L + Exnase II 0.4 μ L + ddH₂O 7.6 μ L, 在 37 °C 条件下反应 1 h。将重组产物加入装有商业化 DH5 α 感受态细胞 100 μ L 的离心管中, 冰上静置转化 30 min, 42 °C 水浴热激 90 s, 冰上静置 5 min, 向混合物中加入 LB 培养基 600 μ L, 37 °C 摇床上 220 r/min 振荡培养 90 min。取菌液 100 μ L 均匀涂布于氨苄西林抗性 LB 平板上, 37 °C 培养箱倒置培养过夜。挑选生长良好的转化菌落, 提取重组质粒的 DNA, 进行 PCR 鉴定、*Xba* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定。选取核酸电泳结果阳性样品送交测序公司测序验证, 根据结果保存载体构建成功的菌种。

2.5 重组 BmkNaTx12-Fc 表达纯化与鉴定

提前培养 HEK293 细胞, 使细胞状态与数量达到转染要求后进行转染; 利用表达载体的菌种进行接菌扩增, 利用质粒 DNA 少量提取试剂盒提取 pTT5-BmkNaTx12-Fc 载体质粒; 利用 Lipofectamine™ 2000 Reagent 进行转染, 收集对照孔和不同时间点的表达上清液, 12 000 r/min 于 4 °C 离心 15 min, 取上清液。分别加入还原/非还原上样缓冲液, 100 °C 煮样 5 min, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。电泳结束后转 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉溶液封闭 2 h, 羊抗人 Fc 抗体 (1:500 稀释) 4 °C 孵育过夜, 经 PBST (含

0.05%吐温)清洗6次后曝光;根据 Western blot 结果显示的最佳表达时间进行大批量转染。收集细胞上清液,加入 PMSF,利用 Protein-A 亲和色谱柱过柱纯化;各步骤取样,进行 SDS-PAGE 电泳,利用考马斯亮蓝染色法观察蛋白表达情况;通过高效液相色谱法检测样品纯度。

2.6 电生理活性检测

传代 HEK293 细胞及 ND7-23 细胞至 3.5 cm 小皿中。每个小皿放 5~6 片无菌盖玻片(8 mm × 8 mm),37 ℃、5% CO₂ 培养 24 h 后,Nav1.7 的转染:采用 Lipofectamine™ 2000 Reagent 的标准流程将 pcDNA3-hNav1.7-EGFP 转染 HEK293 细胞,同时按同样的方法将 pEGFP-Nav1.8 质粒转染 ND7-23 细胞,转染后 2 h 换液,转染后 37 ℃、5% CO₂ 培养过夜,于次日进行电生理检测。电生理记录采用全细胞模式。将转染后含有 Nav1.8-GFP 阳性的 ND7-23 细胞的小玻片放于 pH 7.4 的浴液(CsCl 5 mmol/L, MgCl₂ 1 mmol/L, CaCl₂ 1 mmol/L, CdCl₂ 0.1 mmol/L, Hepes 10 mmol/L, D-glucose 10 mmol/L, TTX 500 nmol/L)中,充有 pH 7.3 的电极内液(CsF 140 mmol/L, EGTA 1 mmol/L, NaCl 10 mmol/L, Hepes 10 mmol/L)的玻璃电极电阻保持在 2~3 MΩ。电生理刺激方法如下,维持静息电位电压为 -70 mV。对细胞进行高阻封接、破膜及电容补偿后实施一系列步阶电压为 5 mV 刺激间隔为 100 ms,从 -20 mV 到 50 mV 的电压刺激,电流数据用 AXON-200B 放大器记录,数据由 clampex 进行记录。破膜补偿稳定 2 min 后记录的数据作为给药前对照,通过给药管给予 BmkNaTx12-Fc(1 μmol/L)刺激。2 min 后用同样的方法再记录 1 次。重复 5 个细胞,数据分析用 clampfit 10.5 软件进行分析。Nav1.7 的全细胞记录方法如下:将转染后含有 Nav1.7-GFP 阳性的 HEK293 细胞的小玻片放于细胞外液(NaCl 140 mmol/L, KCl 3 mmol/L, Hepes 10 mmol/L, MgCl₂ 1 mmol/L, CaCl₂ 1 mmol/L, Dextrose 10 mmol/L)中,装有 pH 7.3 的电极内液(CsF 140 mmol/L, EGTA 1 mmol/L, NaCl 10 mmol/L, Hepes 10 mmol/L)的玻璃电极电阻保持在 2~3 MΩ。电生理刺激方法如下,维持静息电位电压为 -120 mV。对细胞进行高阻封接、破膜及电容补偿后实施一系列 -10 mV 单电压刺激,时间间隔为 5 s。记录 2 min 后,在记录的过程中给予

BmkNaTx12-Fc(1 μmol/L)刺激并记录电流改变。数据处理与上述相同,重复 5 个细胞。

3 结果

3.1 BmkNaTx12 的序列分析

蓝白斑筛选显示重组率为 94.0%,24 个随机挑选的单菌落 PCR 结果均显示含有重组 cDNA,其中由 18 个插入片段大于 1 000 bp,其余 6 个插入片段大于 750 bp,表明构建文库质量较高。cDNA 文库库容量为 1.6×10^6 cfu/mL。挑取的 2 000 个克隆中有 1 217 条不同的序列,经序列比对与毒素相关的多肽为 70 条。

由 cDNA 文库筛选到的毒素 BmkNaTx12 经序列比对(图 1,A)后与来源于墨西哥毒蝎的毒素 Cn12 有 35% 的同源相似度,所以选择以 Cn12 的结构为模板模建 BmkNaTx12 的三维空间结构。

3.2 BmkNaTx12 的同源建模及分子动力学模拟

通过设置生成 4 对二硫键(C12-C62, C16-C39, C25-C44, C29-C46)进行同源建模,根据毒素 Cn12 的结构(图 1,B),对 BmkNaTx12 结构进行模拟(图 1,C,D),选取打分最高的模型(图 1,D)进行分子动力学优化。优化后的 RMSD 结果(图 1,E)表明在 300 ns 后蛋白结构趋于稳定,RMSF 分析结果(图 1,F)显示在 N 端和 C 端波动较大,而在第 20、35、52 个氨基酸处的波动可能由于其所处位置在 loop 区域导致。

3.3 BmkNaTx12 重组表达载体构建

载体 pTT5-BmkNaTx12-Fc 构建完成后以 FP-12 和 RP-12 为引物进行菌落 PCR 鉴定(图 2,B),得到 BmkNaTx12 片段(126 bp)显示其已成功装载进入载体;构建完成后的载体 pTT5-BmkNaTx12-Fc 质粒(图 2,A)经 *Xba* I 和 *Hind* III 进行双酶切鉴定,线性化载体 pTT5-Fc(4 275 bp)和 BmkNaTx12 片段鉴定结果(图 2,C)显示相应片段结果符合。测序结果表明 pTT5-BmkNaTx12-Fc 的序列正确无误。

3.4 重组 BmkNaTx12-Fc 表达纯化

rBmkNaTx12-Fc 蛋白表达选用 HEK293 细胞真核表达系统。为探究时间对蛋白表达的影响,在六孔板中利用重组质粒 pTT5-BmkNaTx12-Fc 转染 HEK293 细胞探究重组蛋白表达的最适时间。转染后 48、72、96、120 h 各时间点取样培养基 200 μL,离

心后取上清液进行 Western blot 检测(图 3,A),未重组载体 ptt5 设为阴性对照,AGAP-Fc 作为阳性对照,结果表明蛋白质量浓度随时间增长而增加。根据 Western blot 结果,选定 120 h 为 rBmkNaTx12 的表达时间。rBmkNaTx12-Fc 表达上清液通过 Protein A 亲

和纯化柱纯化(图 3,B),经 SDS-PAGE 鉴定后表明蛋白经过正确折叠表达(图 3,C)。经 HPLC 验证 rBmkNaTx12 蛋白的纯度达 95%,表明该系统成功表达并纯化了 rBmkNaTx12-Fc 蛋白。

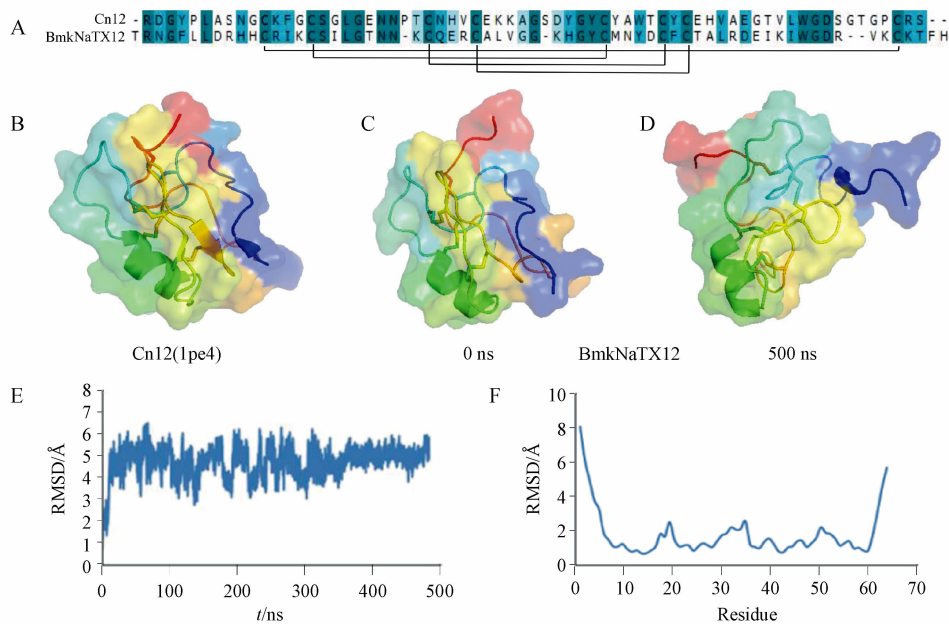


Figure 1 Sequence analysis,homology modeling and molecular dynamics of BmkNaTx12
A;Sequences alignment showed 35% similarity between Cn12 and BmkNaTx12 (A). According to the structure of Cn12 (B) isolated from *Centruroides noxius*,the structure of BmkNaTx12 (C) was simulated through homology modeling. After 500 ns of molecular dynamics,structure of BmkNaTx12 seems to be stable (D) . Stability of amino acids of BmkNaTx12 was tested by RMSD (E) and RMSF (F)simulation with in 500 ns

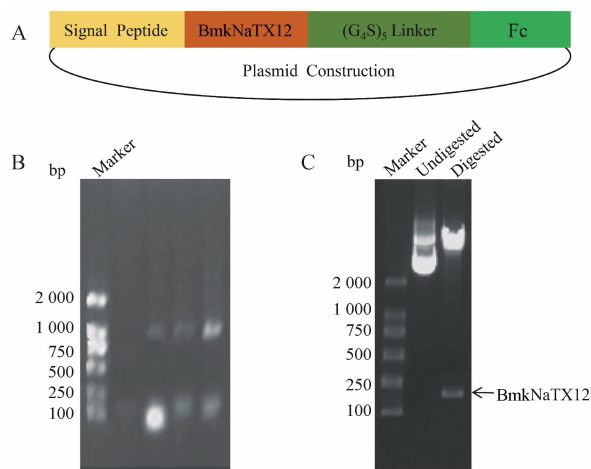


Figure 2 Construction of expression vector of recombinant pTT5-BmkNaTx12-Fc
A;Recombinant vector of pTT5-BmkNaTx12-Fc was constructed; B; Expression vector was identified by PCR;C;Restriction enzyme digestion

3.5 重组 BmkNaTx12-Fc 蛋白电生理活性检测

如图 4 所示,500 nmol/L TTX 不影响 TTX-R

rNav1.8 电流。以 500 nmol/L TTX 作用下的 Nav1.8 作为对照,1 μ mol/L BmkNaTx12-Fc 不影响 Nav1.8 的电流。Nav1.7 是一种典型的 TTX-S 电压门控钠通道,500 nmol/L TTX 能抑制 90% Nav1.7 峰电流。以最大峰电流的单电压刺激结果显示,1 μ mol/L BmkNaTx12-Fc 能增大 20% Nav1.7 峰电流。该结果表明重组的 BmkNaTx12-Fc 能够显著激活 Nav1.7 电流,可能有潜在的致痛作用。

4 讨论

研究发现 Na⁺ 通道毒素是蝎毒中引起动物麻痹和死亡的主要成分^[13],特别是一些钠通道激活剂。如北非肥尾蝎 (*Buthidae Androctonus australis*) 体内的神经毒素 AaH I 可提高钠电流从而心血管及呼吸系统而导致死亡^[14-15],而从伊朗黄蝎 (*Odonthobuthus doriae*) 毒腺中分离得到的毒素 OD1 可明显增强 Nav1.7 通道电流^[16]。

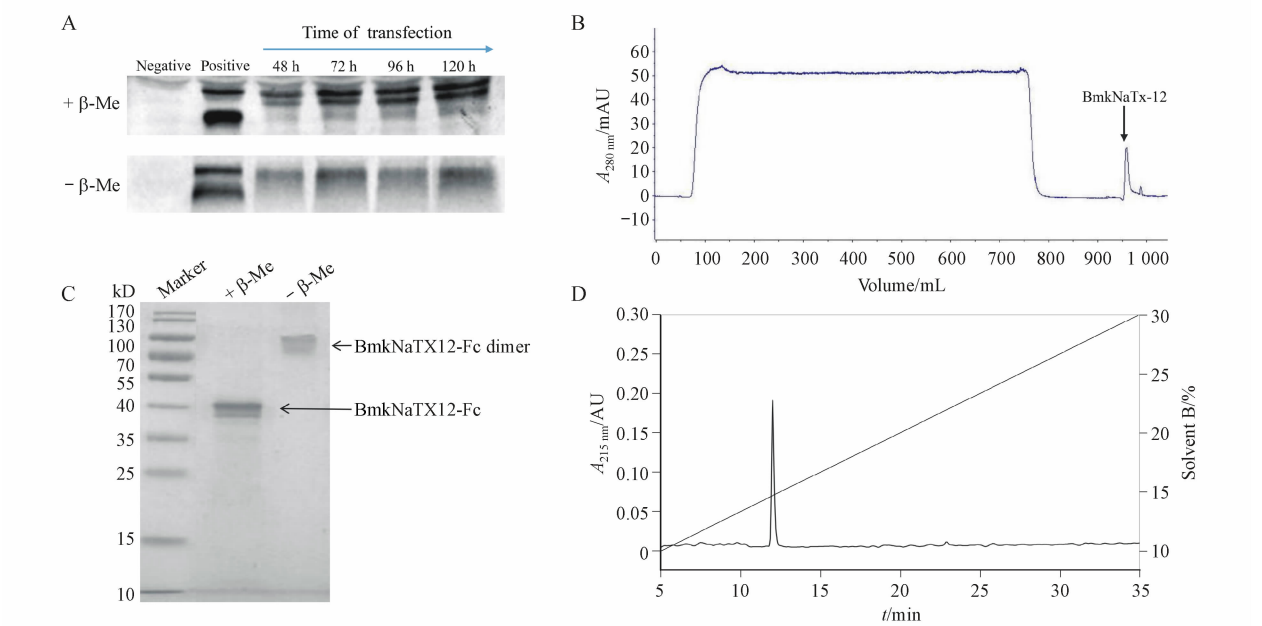


Figure 3 Expression and purification of recombinant BmkNaTx12-Fc protein
A: Expression of rBmkNaTx12 after transfection by Western blot; B: Protein purified by affinity binding with column protein A; C: rBmkNaTx12-Fc was identified by SDS-PAGE and HPLC (D)

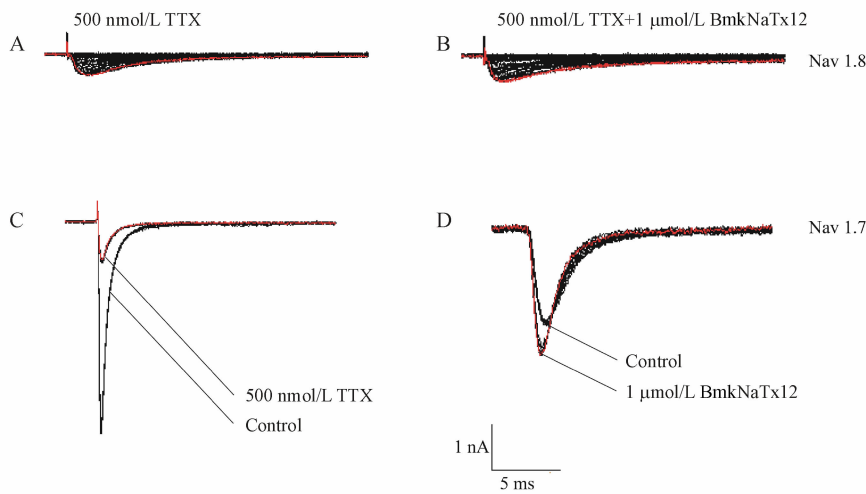


Figure 4 Effect of voltage-sensitive sodium currents by BmkNaTx12
Currents under control conditions and after the addition of 300 nmol/L TTX on rNav1.8 expressed in HEK293 cells (A) and hNav1.7 expressed in ND7-23 cells (C) by the protocol which cells were depolarized to test potentials of -50 mV to $+20$ mV in 10 mV increments from a hold potential of -70 mV to elicit total TTX-R currents. All inward current traces were elicited by a 20 ms depolarizing potential of -10 mV from a holding potential of -120 mV every 20 s, effects of BmkNaTx12 on currents of rNav1.8 (B) and hNav1.7 (D)

本研究中利用 cDNA 文库和转录组技术从山东野生东亚钳蝎毒腺中成功克隆出一种全新的钠通道长链毒素。通过同源比对和分子模拟发现该毒素是一种河豚毒素敏感型的钠通道 α 毒素 BmkNaTx12。该毒素具有 4 对二硫键,具有一个典型的 α 螺旋核心和 β 折叠结构。该结构与墨西哥毒蝎中分离得到的 Cn12 在氨基酸组成和结构具

有一定同源性,研究发现 Cn12 具有类 α -毒素的效应^[17],可减慢钠离子通道的失活,因而推测 BmkNaTx12 为 α -毒素。
长链 α 毒素成熟肽一般含有 $60 \sim 70$ 个氨基酸, $3 \sim 4$ 对二硫键,在蝎毒中含量少,且分离提取非常困难,这也成为限制蝎毒长链 α 毒素走向应用的主要原因^[18-20]。本研究中采用了近年来快速

发展的哺乳动物细胞无血清瞬时高表达技术,构建了一种 Fc 融合表达技术,转染上清液 300 mL 中经亲和纯化后可获得 rBmkNaTx12-Fc 蛋白 2.4 mg,相比于天然产物 Sepherose G50-HPLC 的分离方式(东亚钳蝎蝎毒干粉 0.5 g 可获得最多的毒素单组分蛋白约 0.8 mg,最大得率仅为 0.16%),节省了时间,蛋白得率更高。因此,该表达纯化策略实现了蝎毒素获得高活性,制备高产量,也为长链毒素的活性及应用提供了理论保障。

5 结 论

本研究以东亚钳蝎尾腺总 RNA 为模板,构建了东亚钳蝎毒腺 cDNA 文库,经过测序比对发现了一条全新的 Na^+ 通道毒素 BmkNaTx12,该毒素由 85 个氨基酸组成,成熟肽为 66 个氨基酸,含有 4 对二硫键,与墨西哥毒蝎(*Centruroides noxius*)的 β 毒素 Cn12 具有 35% 的序列同源性。本研究进一步构建了哺乳动物细胞表达系统,通过 Western blot 技术确定重组蛋白最适表达时间,经 Protein A 柱纯化得到 Fc 融合的重组毒素。融合蛋白的 SDS-PAGE 凝胶电泳结果与 Western blot 结果条带一致,证明纯化得到目的蛋白,并通过高效液相检测其纯度达 95%。这为后续开展 BmkNaTx12 的药理学活性研究奠定了物质基础。

参 考 文 献

- [1] Cao Z, Di Z, Wu Y, *et al.* Overview of scorpion species from China and their toxins[J]. *Toxins*, 2014, **6**(3): 796–815.
- [2] Shao J, Zhang R, Ge X, *et al.* Analgesic peptides in *Buthus martensii* Karsch: a traditional Chinese animal medicine the analgesic peptides in scorpion venoms[J]. *Asian J Tradit Med*, 2007(2): 45–50.
- [3] Lu W, Qiu L, Yan Z, *et al.* Cytotoxic T cell responses are enhanced by antigen design involving the presentation of MUC1 peptide on cholera toxin B subunit[J]. *Oncotarget*, 2015, **6**(33): 34537–34548.
- [4] Re LV, Possani LD. Overview of scorpion toxins specific for Na^+ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution[J]. *Toxicon*, 2005, **46**(8): 831–844.
- [5] Campos FV, Chanda B, Beirão PS, *et al.* α -scorpion toxin impairs a conformational change that leads to fast inactivation of muscle sodium channels[J]. *J Gen Physiol*, 2008, **132**(2): 251–63.
- [6] Cw GCC, Tytgat J. An overview of toxins and genes from the venom of the Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch[J]. *Toxicon*, 2002,

- 40**(9): 1239–1258.
- [7] Jin Y, Lee WH, Zeng L, *et al.* Molecular characterization of L-amino acid oxidase from king cobra venom[J]. *Toxicon*, 2007, **50**(4): 479–489.
- [8] Zhou X, Cao P, Tian Y, *et al.* Expressed peptide assay for DNA detection[J]. *J Am Chem Soc*, 2010, **132**(12): 4161–4168.
- [9] Shan LL, Gao JF, Zhang YX, *et al.* Proteomic characterization and comparison of venoms from two elapid snakes (*Bungarus multicinctus* and *Naja atra*) from China[J]. *J Proteomics*, 2016, **138**: 83–94.
- [10] Anangi R, Chen CC, Lin YW, *et al.* Expression in *Pichia pastoris* and characterization of APETx2, a specific inhibitor of acid sensing ion channel 3[J]. *Toxicon*, 2010, **56**(8): 1388–1397.
- [11] PRF Executive Editor. Structural biology: pain-sensing TRPA1 channel resolved[J]. *Nature*, 2015, **520**(7548): 439–441.
- [12] Possani LD, Merino E, Corona M, *et al.* Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels[J]. *Biochimie*, 2000, **82**(9): 861–868.
- [13] Liu LH, Bosmans F, Maertens C, *et al.* Molecular basis of the mammalian potency of the scorpion α -like toxin, BmK MI[J]. *FASEB J*, 2005, **19**(6): 594–596.
- [14] Ye X, Bosmans F, Li C, *et al.* Structural basis for the voltage-gated Na^+ channel selectivity of the scorpion α -like toxin BmK MI[J]. *J Mol Biol*, 2005, **353**(4): 788–803.
- [15] Xiong F, Yan B, Dai WL, *et al.* Analgesic effect of *levo*-corydalmine on neuropathic pain in rats and its mechanism[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2017, **48**(1): 70–75.
- [16] Motin L, Durek T, Adams DJ. Modulation of human $\text{Na}_v1.7$ channel gating by synthetic α -scorpion toxin OD1 and its analogues[J]. *Channels*, 2016, **10**(2): 139–147.
- [17] Chen L, Sun D, Wu M, *et al.* Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of Rv1698, an outer membrane channel protein from *Mycobacterium tuberculosis*. [J]. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2010, **66**(11): 1525–1527.
- [18] Maertens C, Cuypers E, Amininasab M, *et al.* Potent modulation of the voltage-gated sodium channel $\text{Nav}1.7$ by OD1, a toxin from the scorpion *Odontobuthus dorae*[J]. *Mol Pharmacol*, 2006, **70**(1): 405–414.
- [19] O'Brien JE, Sharkey LM, Vallianatos CN, *et al.* Interaction of voltage-gated sodium channel $\text{Nav}1.6$ (SCN8A) with microtubule-associated protein Map1b[J]. *J Biol Chem*, 2012, **287**(22): 18459–18466.
- [20] Del RF, Hernández-Marín E, Pimienta G, *et al.* NMR solution structure of Cn12, a novel peptide from the Mexican scorpion *Centruroides noxius* with a typical β -toxin sequence but with α -like physiological activity[J]. *Eur J Biochem*, 2004, **271**(12): 2504–2516.