

东亚钳蝎神经毒素 BmK CT 三维结构分子建模及晶体生长条件的初步筛选

付月君¹, 杜军¹, 吴艳波², 殷丽天¹, 杨仁佳¹, 史通麟¹, 梁爱华¹

(1. 山西大学 生物技术研究所, 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 山西 太原 030006;

2. 山西大学 分子科学研究所, 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 山西 太原 030006)

摘要: 东亚钳蝎是一类广泛分布于我国且具有重要药用价值的野生资源。其氯离子通道神经毒素(BmK CT)对人脑神经胶质瘤细胞具有靶向特异性的抑制作用。利用 SWISS-MODEL 服务器对 BmK CT 进行蛋白质原子结构的同源建模, 利用 Insight II 软件包对建模结果做能量最小化和分子动力学优化, 获得最佳候选模型。三维结构对比分析表明, BmK CT 与以色列蝎氯通道毒素(Cltx)三维结构极为相似, 均由一个 α -helix 和两个反向平行的 β -sheet 构成, 但 BmK CT 属于 $\beta\alpha\beta$ 型, 而 Cltx 属于 $\alpha\beta\beta$ 型。表面静电势分析表明, BmK CT 和 Cltx 分子表面分布着大量正电势, 暗示两分子功能相似, 且其中的碱性氨基酸及产生的正电势对其与受体结合起决定作用。采用晶体生长试剂盒(Crystal Screening Kit)中的 51 个缓冲液配方筛选 BmK CT 的结晶条件, 在 7 号配方(1.4 mol/L 乙酸钠, 0.1 mol/L 甲次磷酸钠, pH 6.51 中筛选到柱状六边形晶体。

关键词: 东亚钳蝎氯通道神经毒素; 三维结构建模; 表面静电势; 结晶

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2009)05-0020-06

Prediction of Three Dimensional Structure and Filtration of Crystallization Condition of BmK CT

FU Yue-jun¹, DU Jun¹, WU Yan-bo², YIN Li-tian¹,
YANG Ren-jia¹, SHI Tong-lin¹, LIANG Ai-hua¹

(1. Institute of Biotechnology, Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. Institute of Molecular Science, Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: BmK CT, one of the key toxin from *Buthus matensii* Karsch, has been shown to bind specifically to glioma cell surface as a specific chloride channel blocker. In this study, three dimensional structure of BmK CT was modeled and the crystallization condition of BmK CT was filtrated. Prediction of three dimensional structure of BmK CT was performed by SWISS-MODEL workspace and the quality of generated mode was further examined by energy minimization and molecular dynamics (MD) simulation using Insight II 2000 software package. Crystallization of BmK CT was performed using the hanging-drop method. 51 conditions (Crystal Screening Kit, Hampton Research) were used to get good quality and well repeating crystals. The structure of BmK CT and Cltx consisted of a small three-stranded antiparallel β -sheet packed against an α -helix. But BmK CT belonged to $\beta\alpha\beta$ type and Cltx $\alpha\beta\beta$ type. The calculated electrostatic potential surface around the BmK CT and Cltx molecule were found to be mainly positive, which suggested that this clustering of positively charged residues and the strong positive field they produce might well have important implications on the interaction with the receptors. The results showed that hexagonal column crystal could be obtained from a condition containing 1.4 mol/L sodium acetate, 0.1 mol/L Na cacodylate, pH 6.51, at 4 °C and the protein was dissolved in ddH₂O.

Key words: BmK CT; Prediction of three dimensional structures; Electrostatic potential surface; Crystallization

收稿日期: 2009-02-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30700534); 山西省青年科技研究基金资助项目(2008021039)

作者简介: 付月君(1979-), 男, 山西侯马人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事蝎毒素结构与功能的研究。

通讯作者: 梁爱华(1957-), 女, 山西太原人, 教授, 博士生导师, 主要从事细胞分子生物学方面的研究。

东亚钳蝎是一类具有很高药用价值的野生资源,全蝎作为一种传统的药物应用于临床已有悠久的历史。蝎毒的应用研究在国内外发展很快,已经制成包括蝎毒注射粉剂、蝎毒口服胶囊和蝎毒药膏等多种制剂并应用于临床。目前,国内外对蝎毒素的研究主要集中于基因的克隆、毒素蛋白构象、药理学活性的理论研究,此外,蝎昆虫特异性毒素在抗农业虫害方面也有广泛研究^[1,2]。

2003年,美国科学家发现从以色列蝎毒素中分离的一种氯毒素 Cltx 能有效地杀死神经胶质瘤细胞^[3]。分子作用机制研究表明,Cltx 可特异性作用于细胞膜上氯离子通道,在体内外具有抑制神经胶质瘤的作用。一期临床表明,Cltx 在人脑神经胶质瘤部位可至少以较高浓度存在 5 d 以上而无副作用;因其具有安全性和特异性,FDA 已批准该产品进行二期临床试验^[4-6],因此,该毒素有望开发为以离子通道为靶标的新型多肽抗胶质瘤药物。

东亚钳蝎中有一种短链神经毒素在序列上与 Cltx 有很高同源性,被称为类氯离子通道毒素 BmK CT,推测其性质可能类似于以色列蝎毒素 Cltx^[7]。山西大学细胞分子生物学课题组于 2004 年根据大肠杆菌密码子的偏爱性合成了东亚钳蝎类氯离子通道毒素(BmK CT)的基因,在工程菌中获得该重组蛋白,并通过动物急性毒性实验、细胞毒性实验、全细胞膜片钳检测对该蛋白的生物学活性进行了研究^[8,9]。同位素标记跟踪该毒素在 SHG-44 原位荷瘤鼠体内的动力学分布等研究表明,该毒素具有高度选择性的杀死和抑制人脑神经胶质瘤细胞的特点。这说明该毒素在脑神经胶质瘤早期诊断、基因治疗等药物的研发等方面有良好应用前景与开发价值。

本研究利用 SWISS-MODEL 服务器对 BmK CT 进行蛋白质原子结构的同源建模,利用 InsightII 中 Biopolymer 和 Discover3 软件包结果做能量最小化和分子动力学优化,获得最佳候选模型,并采用悬滴法探索了 BmK CT 的结晶条件。研究结果为进一步揭示其空间结构与功能的关系奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

用于 BmK CT 蛋白质结晶条件初步探索所需的材料为:前期表达纯化的蛋白 BmK CT^[8,9]、24 孔细胞培养板、20 mm × 20 mm 盖玻片、高真空绝缘硅脂、Crystal Screen 晶体生长配方试剂盒(Hampton Research 公司产品)。

1.2 方法

在众多从蛋白质的一级序列出发,预测其空间结构的方法中,同源蛋白建模技术的可靠性已被广泛认同。此方法基于如果两个或多个蛋白质具有相关的一级序列,则它们的三维结构相似的假设,从而给出合理的结构,是最具实用性、可靠性的结构预测技术^[10]。

1.2.1 PDB 蛋白质结构数据库及同源序列分析

蛋白质的基本立体结构数据库为 PDB (Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>),该数据库中收集了通过 X 射线衍射和核磁共振(NMR)试验测定的蛋白质结构的精确坐标数据(这种数据即蛋白质中的原子坐标是蛋白质结构的最细致的层次)。它由结构生物信息学合作研究组织(Research Collaboration for Structural Bioinformatics, RCSB, <http://www.rcsb.org/pdb/>)管理和维护。PC 机和工作站上有大量软件工具用于查看 PDB 数据库中的结构,如 Swiss-Pdb Viewer 程序,可将空间结构动态、立体地显现出来。通过同源序列分析,从 PDB 数据库中搜索与 BmK CT 一级序列同源性高的蛋白质晶体用于下一步工作。

1.2.2 SWISS-MODEL 蛋白质同源建模服务器和 DeepView (Swiss Pdb-Viewer) 程序

SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>)是由 Manuel Peitsch 于 1993 年成立,在 GSK (GlaxoSmithKline Geneva) 进一步发展,通过 ExPASy 服务器的瑞士生物信息中心(Swiss Institute of Bioinformatics, SIB)提供使用的,它与专家蛋白质分析系统(Expert Protein Analysis System, ExPASy)紧密相联,其中部分来自于 DeepView (Swiss Pdb-Viewer)程序,目前已有 30 000 个蛋白质三维结构模型,是目前为止应用最为广泛和可靠的蛋白质三维建模服务器,其版本始终在不停的升级完善中^[11]。

1.2.3 同源建模模型的分子动力学优化

为得到 BmK CT 接近天然状态的最佳构象,对同源建模的三维结构进一步用 Insight II 2000 software 中的 Discover3 package 进行分子动力学优化和分子动力学模拟。能量最小化时,采用最陡下降法,溶剂环境选择厚度为 10Å 的水层,其他参数均为系统默认值。分子动力学模拟进行了 150 ps,步长为 1 fs,温度设置为 298 K,以上过程均采用 CVFF (The consistent valence forcefield)力场,最终获得该蛋白的优化分子空间结构模型。

1.2.4 模型表面静电势分析

利用 DeepView 软件对优化后的 BmK CT 模型和已知结构的 Cltx 进行表

面静电势分析, 域值设置采用系统默认值(-1.8 kT/e 设为红色, 1.8 kT/e 设为蓝色), 因为细胞内两个蛋白质分子的相互作用最初都是由表面静电作用引起的, 因此表面静电势分析结果有助于判断 BmK CT 与 Cltx 的功能是否一致。

1.2.5 结晶条件和方法^[12, 13]

1.2.5.1 盖玻片的处理 先用稀盐酸浸泡玻璃片 15 min, 再用清水冲洗干净, 把洗净的玻璃片插到泡沫架上, 晾干, 然后放入带少许硅油的容器中, 抽真空 5 min, 致使硅油沸腾, 然后密闭容器, 放置 40 min, 之后取出硅化好的玻璃片, 用绸布擦拭、吸耳球吹干净备用。

1.2.5.2 24 孔细胞培养板的处理 用清水及超纯水清洗细胞培养板, 置于 37 °C 烘干。往干燥的培养板的培养孔上均匀涂抹一圈真空脂, 培养板的盖子四角用封口膜垫起, 然后盖于涂好真空脂的培养板上备用。

1.2.5.3 采用 Crystal Screen Kit 悬滴法培养晶体的步骤 (Hampton Research HR2-110 和 112) ①采用“吹气法”除去培养晶体用的组织培养板和盖玻片上可能带有的灰尘; ②在组织培养板的孔中加入 0.2 mL 经过超滤的试剂盒缓冲液作为池液, 孔边缘涂上真空脂; ③吸 2 μ L 池液放到硅化后的盖玻片上, 加等体积前期表达纯化的电泳纯 BmK CT 蛋白溶液 (5 mg/mL) 至此池液上, 混合均匀 (避免气泡出现); ④翻转盖玻片盖在孔上 (检查密封是否良好); ⑤放置于 25 °C 恒温室中进行晶体培养 (通常在优化晶体生长过程中, 应避免振动以及温度的大幅度变动); ⑥筛选结晶条件时, 在晶体生长的每 7 d 分别观察一次, 检查结晶情况, 记录液滴表现 (如澄清、沉淀、分相、形成晶体等)。

2 结果与分析

2.1 BmK CT 的同源建模及分子动力学模拟优化

同源序列比对发现, 以色列蝎氯通道毒素 (Cltx) 与 BmK CT 的同源性高达 72%, 且在蛋白结构数据库 (PDB) 中已有相应的通过 NMR 解析的溶液空间构象 (PDB 编号: 1CHL)^[14]。采用 SWISS-MODEL 服务器的 First approach mode^[15-17], 通过 web 界面提交 BmK CT 的氨基酸序列, 发现服务器自动地选择 1ch1A 链作为模板建模。为得到 BmK CT 接近天然状态的最佳构象, 对同源建模的三维结构进一步用 Insight II 2000 software 中的 Discover3 package 进行分子动力学优化和分子动力学模拟 (根据经验值和实际观察, 进行 150 ps、步长为 1 fs 的分子动力学模拟足以使

该分子的总势能达到稳定), 最终获得该蛋白的优化分子空间结构模型 (图 1-a), 模型的总势能为 587.553 kcal/mol, 总动能为 416.630 kcal/mol。

如图 1-a 和 1-b 所示, 经分子动力学模拟优化后的 BmK CT 分子模型和从 NMR 得出的 Cltx (图 1-b) 三维结构极为相似, 均由一个 α -helix 和两个反向平行的 β -sheet 构成, 这与目前已知的短链蝎毒素的三级结构一致。但是通过 SWISS-PdbViewer 3.7 (SP5) 程序发现, BmK CT 与 Cltx 的二级结构在一级顺序的出现是不一致的, BmK CT 属于 $\beta\alpha\beta$ 型, 即在 Gly³-Cys⁵ 区形成 β -sheet, Ala¹⁰-Cys¹⁶ 区形成 α -helix, Pro²⁹-Cys³¹ 区形成 β -sheet; 而 Cltx 属于 $\alpha\beta\beta$ 型, 在 Cys¹⁶-Cys²⁰ 区形成 α -helix, Arg²⁵-Tyr²⁹ 区和 Gln³²-Arg³⁶ 区形成两个 β -sheet, 但在空间结构上两个蛋白的两个 β -sheet 均形成了空间距离较近的反向平行结构, 形成的总体空间结构极为相似。

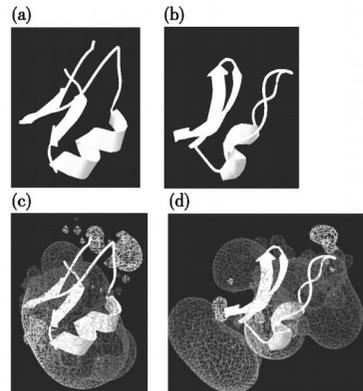


图 1 BmK CT 的同源建模及 BmK CT 与 Cltx 分子三维结构和表面静电势分析

Fig. 1 3D structure homologous simulation of BmK CT and electrostatic potential analysis between BmK CT and Cltx

2.2 BmK CT 和 Cltx 分子表面静电势分析

利用 DeepView 软件对优化后的 BmK CT 模型和已知结构的 Cltx 进行表面静电势分析 (图 1-c 和 1-d), 表明 BmK CT 和 Cltx 分子表面分布着大量正电势, 暗示分子中的碱性氨基酸及产生的正电势对其与受体结合起决定作用。而细胞内两个蛋白质分子的相互作用最初都是由静电作用决定的, 因此从这一方面分析 BmK CT 与 Cltx 的功能是一致的。另外, 我们还发现, Cltx 中位于 α -helix 起始端的 Arg¹⁴ 和 Lys¹⁵ 的突变, 对分子表面静电势的影响较大, 如果将这两个碱性残基突变为中性残基, 可使 α -helix 成为一个由中性到负电势变化的区域, 这一现象同样在 BmK CT 分子模型中出现。这种强的负电势使原来未突变体中 α -helix 表面的正电势完全消失, 而在 β -sheet 表面的正电势仍存在, 使突变体形成正、负电势两极分明的分子。

2.3 BmK CT 蛋白质结晶条件的初步摸索

蛋白质结晶方法是常用的应用气相扩散技术的悬滴法, 因为此方法不但可节省样品而且可有效利用储存空间。它是使任何挥发性的组分在小液滴和大样品池间达到平衡, 使蛋白质液滴中沉淀剂及蛋白质的浓度逐渐增加, 达到过饱和状态, 最终析出晶体。

本研究使用 Hampton Research 公司生产的 Crystal Screening Kit 中的 51 个结晶缓冲液进行晶体条件的初步筛选, 蛋白溶于 ddH₂O 中, 开始时将结晶条件设为 25 °C, 1 d 后观察到大多数缓冲液条件形成沉淀, 后将温度调至 4 °C, 1 d 后发现部分缓冲液条件的沉淀减少。因此, 全部结晶条件均在 4 °C 筛选。

从表 1 可看出, 在 51 个结晶缓冲液条件中, 多数条件出现沉淀和分相现象, 也有部分条件一直保持澄清状态, 在 16, 36, 45, 46, 47 号盐浓度稍高的条件中出现了盐晶, 均不适合 BmK CT 蛋白生长。仅在 7 号和 27 号条件出现蛋白质晶体。7 号条件(1.4 mol/L 乙酸钠, 0.1 mol/L 甲次砷酸钠, pH 6.51)在 20 d 左右出现柱状六边形晶体(图 2), 其后观察该晶体较为稳定, 但未见生长, 这可能由于蛋白的浓度(5 mg/mL) 仍较低。27 号条件在 30 d 左右也出现长方

体晶体, 但 7 d 后发现该晶体一角缺失, 尚不能确定是否是单晶。通过以上分析得出, 7 号条件形成的柱状六边形晶体为 BmK CT 的蛋白晶体。从理论上讲, 沉淀剂与蛋白浓度之间的关系对结晶成功与否有重要影响, 可通过调整温度和沉淀剂的浓度来维持一个低水平的蛋白过饱和度, 当蛋白从饱和溶液中慢慢地沉淀, 晶体便可析出。因此, 下一步工作拟对结晶条件(包括温度和沉淀剂浓度)进行优化, 以期达到可进行 X 射线衍射的条件。

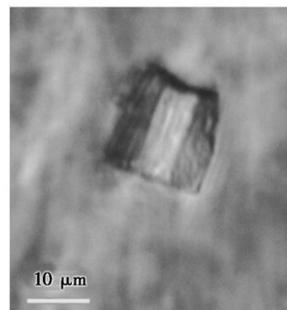


图 2 BmK CT 在 7 号条件的柱状六边形晶体(70 d, 400 倍)

Fig. 2 Hexagonal column crystal of BmK CT(70 d 400× original magnification)

表 1 结晶条件缓冲液配方及晶体生长情况

Tab. 1 Crystal screen scoring sheet and growth observations of the crystal

代号 Code	成分 Contents	天数/d Days 30	天数/d Days 60	代号 Code	成分 Contents	天数/d Days 30	天数/d Days 60
1	30% 甲基丙二醇, 0.1 mol/L 乙酸钠, 0.02 mol/L 氯化钙, pH 4.6	+, ○	++, ○	2	0.4 mol/L 酒石酸钾盐	+	++
3	0.4 mol/L 磷酸铵	澄清	澄清	4	2.0 mol/L 硫酸铵, 0.1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸, pH 8.5	+	+, ○
5	30% 甲基丙二醇, 0.1 mol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸钠, 0.2 mol/L 柠檬酸钠, pH 7.5	○	+, ○	6	30% 聚乙二醇 4000, 0.1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷 盐酸, 0.2 mol/L 氯化镁, pH 8.5	澄清	++
7	1.4 mol/L 乙酸钠, 0.1 mol/L 甲次砷酸钠, pH 6.5	+, 多边形透明晶体	+, 柱状六边形晶体未生长	8	30% 异丙醇, 0.1 mol/L 甲次砷酸钠, 0.2 mol/L 柠檬酸钠, pH 6.5	○	○
9	30% 聚乙二醇 4000, 0.1 mol/L 柠檬酸钠, 0.2 mol/L 乙酸铵, pH 5.6	○	○	10	30% 聚乙二醇 4000, 0.1 mol/L 乙酸钠, 0.2 mol/L 乙酸铵, pH 4.6	澄清	○
11	1.0 mol/L 磷酸铵, 0.1 mol/L 柠檬酸钠, pH 5.6	+	+	12	30% 异丙醇, 0.1 mol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸钠, 0.2 mol/L 氯化镁, pH 7.5	澄清	澄清
13	30% 聚乙二醇 400, 0.1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷 盐酸, 0.2 mol/L 柠檬酸钠, pH 8.5	+, ○	+, ○	14	28% 聚乙二醇 400, 0.1 mol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸钠, 0.2 mol/L 氯化钙, pH 7.5	+, 多处亮点(晶核?)	+, 亮点消失
15	30% 聚乙二醇 8000, 0.1 mol/L 甲次砷酸钠, 0.2 mol/L 硫酸铵, pH 6.5	○	○	16	1.5 mol/L 硫酸锂, 0.1 mol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸钠, pH 7.5	+, 针状盐晶	+, 盐晶长大
17	30% 聚乙二醇 4000, 0.1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷 盐酸, 0.2 mol/L 硫酸锂, pH 8.5	○	○	18	20% 聚乙二醇 8000, 0.1 mol/L 甲次砷酸钠, 0.2 mol/L 乙酸镁, pH 6.5	+	+
19	30% 异丙醇, 0.1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷 盐酸, 0.2 mol/L 乙酸铵, pH 8.5	+	++	20	25% 聚乙二醇 4000, 0.1 mol/L 乙酸钠, 0.2 mol/L 硫酸铵, pH 4.6	++	++
21	30% 甲基丙二醇, 0.1 mol/L 甲次砷酸钠, 0.2 mol/L 乙酸镁, pH 6.5	○	○	22	30% 聚乙二醇 4000, 0.1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷 盐酸, 0.2 mol/L 乙酸钠, pH 8.5	澄清	澄清

续表 1

代号 Code	成分 Contents	天数/d Days 30	天数/d Days 60	代号 Code	成分 Contents	天数/d Days 30	天数/d Days 60
23	30% 聚乙二醇 400, 0.1 mol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸钠, 0.2 mol/L 氯化镁, pH 7.5	+	++	24	20% 异丙醇, 0.1 mol/L 乙酸钠, 0.2 mol/L 氯化钙, pH 4.6	澄清	+
25	1.0 mol/L 乙酸钠, 0.1 mol/L 咪唑, pH 6.5	澄清	澄清	26	30% 甲基丙二醇, 0.1 mol/L 柠檬酸钠, 0.2 mol/L 乙酸钠, pH 5.6	+, 褐色块状沉淀	+, 沉淀未生长
27	20% 异丙醇, 0.1 mol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸钠, 0.2 mol/L 柠檬酸钠, pH 7.5	+, 长方体晶体	晶体大小, 形状未变化	28	30% 聚乙二醇 8000, 0.1 mol/L 甲次砷酸钠, 0.2 mol/L 乙酸钠, pH 6.5	澄清	澄清
29	0.8 mol/L 酒石酸钠钾盐, 0.1 mol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸钠, pH 7.5	○	○	30	30% 聚乙二醇 8000, 0.2 mol/L 硫酸铵	○	○
31	30% 聚乙二醇 4000, 0.2 mol/L 硫酸铵	澄清	澄清	32	2.0 mol/L 硫酸铵	+	++
33	4.0 mol/L 甲酸钠	澄清	澄清	34	2.0 mol/L 甲酸钠, 0.1 mol/L 乙酸钠, pH 4.6	++, ○	+, ○
35	1.6 mol/L 磷酸钠钾盐, 0.1 mol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸钠, pH 7.5	澄清	澄清	36	8% 聚乙二醇 8000, 0.1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷 盐酸, pH 8.5	+, 针状盐晶	+, 针状成簇
37	8% 聚乙二醇 4000, 0.1 mol/L 乙酸钠, pH 4.6	++	++	38	1.4 mol/L 柠檬酸钠, 0.1 mol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸钠, pH 7.5	+, ○	+, ○
39	2% 聚乙二醇 400, 0.1 mol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸钠, 2.0 mol/L 硫酸铵, pH 7.5	○	+, ○	40	20% 异丙醇, 0.1 mol/L 柠檬酸钠, 20% 聚乙二醇 4000, pH 5.6	○	+, ○
41	10% 异丙醇, 0.1 mol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸钠, 20% 聚乙二醇 4000, pH 7.5	+	++	42	20% 聚乙二醇 8000, 0.05 mol/L 磷酸钾	+	++
43	30% 聚乙二醇 1500	澄清	澄清	44	0.2 mol/L 甲酸镁	澄清	澄清
45	18% 聚乙二醇 8000, 0.1 mol/L 甲次砷酸钠, 0.2 mol/L 乙酸锌, pH 6.5	+	++, 针状盐晶	46	18% 聚乙二醇 8000, 0.1 mol/L 甲次砷酸钠, 0.2 mol/L 乙酸钙, pH 6.5	+, 针状盐晶	+, 针簇状盐晶
47	2.0 mol/L 硫酸铵, 0.1 mol/L 乙酸钠, pH 4.6	+	++, 棒状盐晶	48	2.0 mol/L 磷酸铵, 0.1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷 盐酸, pH 8.5	++	++
49	2% 聚乙二醇 8000, 1.0 mol/L 硫酸锂	○	++, ○	50	15% 聚乙二醇 8000, 0.5 mol/L 硫酸锂	○	○
51	10% 聚乙二醇 6000, 2.0 mol/L 氯化钠	+	+				

注: +. 少量沉淀; ++. 大量沉淀; ○. 分相。

Note: +. Little precipitation; ++. More precipitation; ○. Phase splitting.

3 结论

已有研究证实了蝎氯离子通道神经毒素 (Cltx 和 BmK CT) 在治疗脑神经胶质瘤中有两种途径 (抑制电压依赖性氯通道 ClC 和肿瘤细胞表面的基质金属蛋白酶 MMP-2 的活性)^[18, 19]。本研究利用生物信息学的相关服务器和软件构建了东亚钳蝎神经毒素 (BmK CT) 的三维结构模型, 证明了 BmK CT 与以色列蝎氯通道毒素 (Cltx) 三维结构极为相似, 但二级结构在一级顺序上的排列却有不同。BmK CT 和 Cltx 分子表面分布着大量正电势, 且其中的碱性氨基酸及产生的正电势对其与受体结合起决定作用, 通过以上两方面对比分析, 推测 BmK CT 与以色列蝎氯通道毒素 (Cltx) 的生物学功能具有相似性。

本研究对 BmK CT 的结晶条件进行了初步筛选, 在 7 号配方 (1.4 mol/L 乙酸钠, 0.1 mol/L 甲次砷酸钠, pH 6.51) 中筛选到柱状六边形晶体。计划下一步开展该晶体的 X 衍射和结构解析工作, 本研究通过对 BmK CT 结构的研究, 有助于最终构建以氯通道毒素空间结构为骨架优化设计的、新型的具有对神经胶质瘤细胞高选择性和高特异性的活性蛋白分子模型, 有助于在空间结构和分子水平上揭示氯通道神经毒素与神经胶质瘤细胞膜受体的分子作用机制。

参考文献:

[1] 范晓军, 曹建斌, 许成钢, 等. 重组杆状病毒 (AcMNPV-BmK IT-Chi) 的杀虫活性和安全性初步研究[J]. 华北农学报, 2007, 22(5): 161-164.

- [2] 杨利艳, 孙毅, 崔贵梅. 转双价基因抗虫杨抑制美国白蛾的作用机理研究[J]. 华北农学报, 2008, 23(5): 157—160.
- [3] Deshane J, Garaener C G, Sontheimer H. Chlorotoxin Inhibits Glioma cell Invasion via Matrix Metalloproteinase-2[J]. J Biol Chem, 2003, 278: 4135—4144.
- [4] Burton J B, Johnson M, Sato M, *et al.* Adenovirus-mediated gene expression imaging to directly detect sentinel lymph node metastasis of prostate cancer[J]. Nat Med, 2008, 14: 882—888.
- [5] Shen S, Khazaeli M B, Gillespie G Y, *et al.* Radiation dosimetry of ¹³¹I-chlorotoxin for targeted radiotherapy in glioma-bearing mice[J]. J Neurooncol, 2005, 71: 113—119.
- [6] Veishen M, Gabikian B, Bahrami S B, *et al.* Tumor Paint: A Chlorotoxin-Cy5.5 Bioconjugate for Intraoperative Visualization of Cancer Foci[J]. Cancer Res, 2007, 67: 6882—6888.
- [7] Zeng X C, Li W X, Zhu S Y, *et al.* Cloning and characterization of a cDNA sequence encoding the precursor of a chlorotoxin-like peptide from the Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch[J]. Toxicon, 2000, 38: 1009—1041.
- [8] Fu Y J, Yin L T, Liang A H, *et al.* Therapeutic potential of chlorotoxin-like neurotoxin from the Chinese scorpion for human gliomas[J]. Neurosci Lett, 2007, 412(1): 62—67.
- [9] Fu Y J, Yin L T, Liang A H. Polyclonal Antibody Against a Recombinant Chlorotoxin-like Peptide from the Chinese Scorpion and Detection of its Putative Receptors in Human Glioma Cells[J]. Biotechnol Lett, 2006, 28(18): 1439—1443.
- [10] Kroemer R T, Doughty S W, Robinson A J, *et al.* Prediction of the three-dimensional structure of human interleukin-7 by homology modeling[J]. Protein Eng, 1996, 9: 493—498.
- [11] 谌容, 陈敏, 杨春贤, 等. 基于 SWISS-MODEL 的蛋白质三维结构建模[J]. 生命的化学, 2006, 26(1): 54—56.
- [12] 贺晓静. 八肋游仆虫中心蛋白的研究[D]. 太原: 山西大学, 2005.
- [13] 赵南明, 周海梦. 生物物理学[M]. 柏林: 施普林格出版社, 2000: 385.
- [14] Lippens G, Najib J, Wodak S J, *et al.* NMR sequential assignments and solution structure of chlorotoxin, a small scorpion toxin that blocks chloride channels[J]. Biochemistry, 1995, 34: 13—21.
- [15] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, *et al.* The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling[J]. 2003, 31: 3381—3385.
- [16] Schwede T, Kopp J, Guex N, *et al.* SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server[J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31: 3381—3385.
- [17] Guex N, Peitsch M C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling[J]. Electrophoresis, 1997, 18: 2714—2723.
- [18] Lyons S A, O'Neal J, Sontheimer H. Chlorotoxin, a scorpion-derived peptide, specifically binds to gliomas and tumors of neuroectodermal origin[J]. Glia, 2002, 39: 162—173.
- [19] Deshane J, Garner C C, Sontheimer H. Chlorotoxin inhibits glioma cell invasion via matrix metalloproteinase-2[J]. J Biol Chem, 2003, 278: 4135—4144.