



同济大学 1907-2017
Tongji University



同济博士论丛
TONGJI Dissertation Series

总主编 伍江 副总主编 雷星晖

彭 灿 戚正武 著

中国南海新型芋螺毒素的 克隆、纯化、结构和功能研究

Cloning, Purification, Structural and Functional
Characterization of Novel Conotoxins from
South China Sea



同济大学出版社
TONGJI UNIVERSITY PRESS



同济博士论丛
TONGJI Dissertation Series

总主编 伍江 副总主编 雷星晖

彭 灿 戚正武 著

中国南海新型芋螺毒素的 克隆、纯化、结构和功能研究

Cloning, Purification, Structural and Functional
Characterization of Novel Conotoxins from
South China Sea



同济大学出版社
TONGJI UNIVERSITY PRESS

内 容 提 要

芋螺毒素是一类富含二硫键(也有少数不含二硫键)的活性多肽,多数由10~40个氨基酸组成,能特异地作用于各种离子通道和神经递质受体。本书深入研究了其分子结构和生理学特性,为芋螺毒素的研究与开发作出了重要的贡献。

图书在版编目(CIP)数据

中国南海新型芋螺毒素的克隆、纯化、结构和功能研究 / 彭灿,戚正武著. —上海:同济大学出版社,2019.5
(同济博士论丛 / 伍江总主编)
ISBN 978-7-5608-6989-6

I. ①中… II. ①彭… ②戚… III. ①南海—蜗牛—毒素—研究—中国 IV. ①Q959.212

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 100266 号

中国南海新型芋螺毒素的克隆、纯化、结构和功能研究

彭 灿 戚正武 著

出 品 人 华春荣 责任编辑 陈红梅 卢元姗
责任校对 徐春莲 封面设计 陈益平

出版发行 同济大学出版社 www.tongjipress.com.cn
(地址:上海市四平路 1239 号 邮编:200092 电话:021-65985622)
经 销 全国各地新华书店
排版制作 南京展望文化发展有限公司
印 刷 浙江广育爱多印务有限公司
开 本 787 mm×1092 mm 1/16
印 张 13
字 数 260 000
版 次 2019 年 5 月第 1 版 2019 年 5 月第 1 次印刷
书 号 ISBN 978-7-5608-6989-6

定 价 62.00 元

本书若有印装质量问题,请向本社发行部调换 版权所有 侵权必究

“同济博士论丛”编写领导小组

组 长：杨贤金 钟志华

副 组 长：伍 江 江 波

成 员：方守恩 蔡达峰 马锦明 姜富明 吴志强
徐建平 吕培明 顾祥林 雷星晖

办公室成员：李 兰 华春荣 段存广 姚建中

“同济博士论丛”编辑委员会

总 主 编：伍 江

副 总 主 编：雷星晖

编委会委员：（按姓氏笔画顺序排列）

丁晓强	万 钢	马卫民	马在田	马秋武	马建新
王 磊	王占山	王华忠	王国建	王洪伟	王雪峰
尤建新	甘礼华	左曙光	石来德	卢永毅	田 阳
白云霞	冯 俊	吕西林	朱合华	朱经浩	任 杰
任 浩	刘 春	刘玉擎	刘滨谊	闫 冰	关侗红
江景波	孙立军	孙继涛	严国泰	严海东	苏 强
李 杰	李 斌	李风亭	李光耀	李宏强	李国正
李国强	李前裕	李振宇	李爱平	李理光	李新贵
李德华	杨 敏	杨东援	杨守业	杨晓光	肖汝诚
吴广明	吴长福	吴庆生	吴志强	吴承照	何品晶
何敏娟	何清华	汪世龙	汪光焘	沈明荣	宋小冬
张 旭	张亚雷	张庆贺	陈 鸿	陈小鸿	陈义汉
陈飞翔	陈以一	陈世鸣	陈艾荣	陈伟忠	陈志华
邵嘉裕	苗夺谦	林建平	周 苏	周 琪	郑军华
郑时龄	赵 民	赵由才	荆志成	钟再敏	施 骞
施卫星	施建刚	施惠生	祝 建	姚 熹	姚连璧

袁万城	莫天伟	夏四清	顾 明	顾祥林	钱梦騄
徐 政	徐 鉴	徐立鸿	徐亚伟	凌建明	高乃云
郭忠印	唐子来	閻耀保	黄一如	黄宏伟	黄茂松
戚正武	彭正龙	葛耀君	董德存	蒋昌俊	韩传峰
童小华	曾国荪	楼梦麟	路秉杰	蔡永洁	蔡克峰
薛 雷	霍佳震				

秘书组成员：谢永生 赵泽毓 熊磊丽 胡晗欣 卢元姗 蒋卓文

总序

在同济大学 110 周年华诞之际，喜闻“同济博士论丛”将正式出版发行，倍感欣慰。记得在 100 周年校庆时，我曾以《百年同济，大学对社会的承诺》为题作了演讲，如今看到付梓的“同济博士论丛”，我想这就是大学对社会承诺的一种体现。这 110 部学术著作不仅包含了同济大学近 10 年 100 多位优秀博士研究生的学术科研成果，也展现了同济大学围绕国家战略开展学科建设、发展自我特色，向建设世界一流大学的目标迈出的坚实步伐。

坐落于东海之滨的同济大学，历经 110 年历史风云，承古续今、汇聚东西，秉持“与祖国同行、以科教济世”的理念，发扬自强不息、追求卓越的精神，在复兴中华的征程中同舟共济、砥砺前行，谱写了一幅幅辉煌壮美的篇章。创校至今，同济大学培养了数十万工作在祖国各条战线上的人才，包括人们常提到的贝时璋、李国豪、裘法祖、吴孟超等一批著名教授。正是这些专家学者培养了一代又一代的博士研究生，薪火相传，将同济大学的科学研究和学科建设一步步推向高峰。

大学有其社会责任，她的社会责任就是融入国家的创新体系之中，成为国家创新战略的实践者。党的十八大以来，以习近平同志为核心的党中央高度重视科技创新，对实施创新驱动发展战略作出一系列重大决策部署。党的十八届五中全会把创新发展作为五大发展理念之首，强调创新是引领发展的第一动力，要求充分发挥科技创新在全面创新中的引领作用。要把创新驱动发展作为国家的优先战略，以科技创新为核心带动全面创新，以体制机制改

革激发创新活力,以高效率的创新体系支撑高水平的创新型国家建设。作为人才培养和科技创新的重要平台,大学是国家创新体系的重要组成部分。同济大学理当围绕国家战略目标的实现,作出更大的贡献。

大学的根本任务是培养人才,同济大学走出了一条特色鲜明的道路。无论是本科教育、研究生教育,还是这些年摸索总结出的导师制、人才培养特区,“卓越人才培养”的做法取得了很好的成绩。聚焦创新驱动转型发展战略,同济大学推进科研管理体系改革和重大科研基地平台建设。以贯穿人才培养全过程的一流创新创业教育助力创新驱动发展战略,实现创新创业教育的全覆盖,培养具有一流创新力、组织力和行动力的卓越人才。“同济博士论丛”的出版不仅是对同济大学人才培养成果的集中展示,更将进一步推动同济大学围绕国家战略开展学科建设、发展自我特色、明确大学定位、培养创新人才。

面对新形势、新任务、新挑战,我们必须增强忧患意识,扎根中国大地,朝着建设世界一流大学的目标,深化改革,勠力前行!

万 钢

2017年5月

论丛前言

承古续今,汇聚东西,百年同济秉持“与祖国同行、以科教济世”的理念,注重人才培养、科学研究、社会服务、文化传承创新和国际合作交流,自强不息,追求卓越。特别是近20年来,同济大学坚持把论文写在祖国的大地上,各学科都培养了一大批博士优秀人才,发表了数以千计的学术研究论文。这些论文不但反映了同济大学培养人才能力和学术研究的水平,而且也促进了学科的发展和国家的建设。多年来,我一直希望能有机会将我们同济大学的优秀博士论文集中整理,分类出版,让更多的读者获得分享。值此同济大学110周年校庆之际,在学校的支持下,“同济博士论丛”得以顺利出版。

“同济博士论丛”的出版组织工作启动于2016年9月,计划在同济大学110周年校庆之际出版110部同济大学的优秀博士论文。我们在数千篇博士论文中,聚焦于2005—2016年十多年间的优秀博士学位论文430余篇,经各院系征询,导师和博士积极响应并同意,遴选出近170篇,涵盖了同济的大部分学科:土木工程、城乡规划学(含建筑、风景园林)、海洋科学、交通运输工程、车辆工程、环境科学与工程、数学、材料工程、测绘科学与工程、机械工程、计算机科学与技术、医学、工程管理、哲学等。作为“同济博士论丛”出版工程的开端,在校庆之际首批集中出版110余部,其余也将陆续出版。

博士学位论文是反映博士研究生培养质量的重要方面。同济大学一直将立德树人作为根本任务,把培养高素质人才摆在首位,认真探索全面提高博士研究生质量的有效途径和机制。因此,“同济博士论丛”的出版集中展示同济大

学博士研究生培养与科研成果,体现对同济大学学术文化的传承。

“同济博士论丛”作为重要的科研文献资源,系统、全面、具体地反映了同济大学各学科专业前沿领域的科研成果和发展状况。它的出版是扩大传播同济科研成果和学术影响力的重要途径。博士论文的研究对象中不少是“国家自然科学基金”等科研基金资助的项目,具有明确的创新性和学术性,具有极高的学术价值,对我国的经济、文化、社会发展具有一定的理论和实践指导意义。

“同济博士论丛”的出版,将会调动同济广大科研人员的积极性,促进多学科学术交流、加速人才的发掘和人才的成长,有助于提高同济在国内外的竞争力,为实现同济大学扎根中国大地,建设世界一流大学的目标愿景做好基础性工作。

虽然同济已经发展成为一所特色鲜明、具有国际影响力的综合性、研究型大学,但与世界一流大学之间仍然存在着一定差距。“同济博士论丛”所反映的学术水平需要不断提高,同时在很短的时间内编辑出版 110 余部著作,必然存在一些不足之处,恳请广大学者,特别是有关专家提出批评,为提高同济人才培养质量和同济的学科建设提供宝贵意见。

最后感谢研究生院、出版社以及各院系的协作与支持。希望“同济博士论丛”能持续出版,并借助新媒体以电子书、知识库等多种方式呈现,以期成为展现同济学术成果、服务社会的一个可持续的出版品牌。为继续扎根中国大地,培育卓越英才,建设世界一流大学服务。

伍 江

2017 年 5 月

前言

芋螺是一种生活在热带海洋浅水区的软体动物,其毒液管分泌的芋螺毒素是芋螺捕食的主要武器。芋螺毒素是一类富含二硫键(也有少数不含二硫键)的活性多肽,多数由 10~40 个氨基酸组成,能特异地作用于各种离子通道和神经递质受体。根据信号肽序列和半胱氨酸骨架的不同,芋螺毒素可以分为 7 个主要的超家族: A-、T-、O-、M-、P-、I-和 S-超家族,最近还发现了 L-和 J-超家族。与其他动物毒素相比,芋螺毒素具有分子量小、结构稳定、序列超变异、作用靶点广泛、功能专一及组织特异性强等优点,既可以被用作神经生物学研究的探针,也可以被直接开发成药物或作为药物的先导化合物。因此对芋螺毒素的研究具有重要的理论意义和实际意义。

本书第一部分以我国南海特有芋螺物种为研究对象,通过 RT-PCR 和 RACE 的方法,从花玛瑙芋螺、小牛芋螺、芝麻芋螺、信号芋螺和处女芋螺中得到 A-、I₂-、M-、O-、T-1 芋螺毒素基因超家族共 38 条全新 cDNA 序列,保存了这些芋螺物种的基因资源。对新毒素序列进行同源比对和进化树分析发现,A-超家族和 M-超家族中存在新的二硫键骨架,其中具有半胱氨酸骨架 14 的 A-超家族成员 pul4a 的发现,使我们对该超家族中各家族芋螺毒素的演变进化过程有了新的认识。6 个 T-1 超家族芋螺毒素的前导肽和成熟肽区具有明显的序列超变异。我们详细的序列分析,为进一步系统研究芋螺毒素的结构与功能、寻找具有开发应用前景的毒素分子奠定了基础。

本书第二部分通过分离纯化、cDNA 克隆和 NMR 波谱技术,对采自中

国南海的食虫性处女芋螺的毒素成分进行了研究。 α -芋螺毒素 ViIA 具有两种天然存在的二硫键异构体,这是目前在同一芋螺毒素中的首次发现,在另一水平上反映了芋螺毒素的多样性。O-超家族芋螺毒素 vi6a 含 32 个氨基酸并富含甘氨酸残基。和其他含 6 个半胱氨酸的 four-loop 芋螺毒素进行比较,揭示 vi6a 代表该结构家族中一类新颖独特的成员。我们对 vi6a 的溶液结构研究,是对分离自西太平洋食虫性芋螺物种中 O-芋螺毒素的首次结构鉴定,为以后的构效关系和对 vi6a 与靶受体相互作用的理解奠定基础。芋螺毒素 vi15a 含 27 个残基和 8 个半胱氨酸。根据其前体肽 N 端的信号肽序列和成熟肽中全新的半胱氨酸骨架,将其定义为新的基因超家族——V-芋螺毒素。我们克隆了其他编码 V-芋螺毒素的 cDNA,进一步将这些新毒素分为三组,并对含 8 个半胱氨酸的神经毒素进行了系统比较分析。我们还对采自中国南海的食虫性信号芋螺和食鱼性花玛瑙芋螺的毒液成分进行了分离纯化和分子量鉴定。

本书第三部分对 7 条中国南海新型芋螺毒素进行了固相化学合成、体外氧化折叠、溶液结构和功能研究。Qc1.2 是第一个从食虫性芋螺中得到的 α 4/4-芋螺毒素,与从食鱼性芋螺中克隆得到的 BuIA 和 Sl.1 的同源性较低; α 4/7-芋螺毒素 Lp1.1 和 Lp1.4 的序列较为相似,但 Lp1.1 的第一个 loop 中不具有保守的 Ser 和 Pro,也罕见地存在 3 个 Ala,且在其他 α -芋螺毒素中出现频率较高的第 5 位酸性或疏水性氨基酸被碱性的 Arg 所替代,对二者的功能对比研究将帮助我们,探讨 Lp1.1 的特殊序列对生理活性的影响; α 4/7-芋螺毒素 Mr1.1 是这几种芋螺毒素中唯一来自食其他软体动物芋螺物种的,具有一定镇痛活性,对其分子靶标的鉴定将有助于对 α -芋螺毒素镇痛机制的理解;pul4a 是 nAChR 的新型拮抗剂,对急性分离的小鼠颈上交感神经节神经元上电压门控型钾通道无影响。通过 NMR 确定 pul4a 的溶液结构含有一个 α -螺旋和两个转角,极性侧链从分子核心发散开来,其表面的疏水 patch 与其他 nAChR 拮抗剂相近。分子中的 2 对二硫键(C2 - C15 和

C13 - C19)稳定了 pul4a 的骨架并形成了 2 个 loop——loop1 (P3 - K12)和 loop2 (V14 - T18),长度比为 10 : 5。pul4a 因具有较长的 loop1,故分子表现为“v”形骨架结构,与具有“ω”形骨架结构的 α -芋螺毒素的 loop 区具有明显差异。因此,pul4a 代表 A-超家族中含有半胱氨酸骨架 14 的一类全新成员。对这 7 条新型芋螺毒素的详细功能分析,为今后的构效关系研究奠定了基础,并能有效地辅助基于结构的高效、高选择性药物分子的设计研究。

目 录

总序

论丛前言

前言

第 1 章 引言	1
1.1 芋螺的生物学	1
1.2 芋螺毒素的分类和命名规则	2
1.3 芋螺毒素的分子生物学特征	4
1.4 芋螺毒素的翻译后修饰	5
1.5 芋螺毒素的生理活性	8
1.5.1 乙酰胆碱受体的选择性拮抗剂： α -、 αA -和 ψ -芋螺毒素	8
1.5.2 钠离子通道拮抗剂： μ -、 μO -和 δ -芋螺毒素	11
1.5.3 钙离子通道选择性拮抗剂： ω -芋螺毒素	15
1.5.4 钾离子通道的阻断剂或激动剂： κ -、 κA -、 κM -和 κI -芋螺毒素	17
1.5.5 NMDA 受体拮抗剂：conantokin	19
1.5.6 Contryphan	21
1.5.7 其他	22
1.6 广阔的应用前景和潜在的开发价值	23
1.7 展望	24

第 2 章 中国南海新型芋螺毒素的 cDNA 克隆及序列分析	25
2.1 概述	25
2.2 材料	27
2.2.1 组织样品	27
2.2.2 试剂	27
2.2.3 菌株	28
2.2.4 培养基	28
2.2.5 缓冲液	28
2.2.6 提取 RNA 的实验用品	29
2.2.7 常用仪器设备	29
2.3 方法	29
2.3.1 注意事项	29
2.3.2 芋螺毒管的处理	30
2.3.3 总 RNA 的提取	30
2.3.4 芋螺毒管 cDNA 的合成	30
2.3.5 各基因超家族芋螺毒素序列的同源检索及分析	32
2.4 结果和讨论	33
2.4.1 芋螺毒管总 RNA 的提取	33
2.4.2 A-超家族芋螺毒素 cDNA 序列的克隆及序列分析	33
2.4.3 I ₂ -芋螺毒素 cDNA 序列的克隆及序列分析	43
2.4.4 M-超家族芋螺毒素 cDNA 序列的克隆及序列分析	48
2.4.5 O-超家族芋螺毒素 cDNA 序列的克隆及序列分析	59
2.4.6 T-1 家族芋螺毒素 cDNA 序列的克隆及序列分析	63
第 3 章 中国南海处女芋螺中新型芋螺毒素的分离纯化、cDNA 克隆和溶液结构研究	73
3.1 概述	73
3.2 材料和方法	74
3.2.1 材料	74
3.2.2 粗毒的提取	74
3.2.3 凝胶色谱分级纯化	74
3.2.4 反相柱分离纯化	75

3.2.5	分子量测定	75
3.2.6	蛋白还原和烷基化	75
3.2.7	蛋白序列测定	76
3.2.8	总 RNA 抽提和第一链 cDNA 的合成	76
3.2.9	3'RACE 和 5'RACE	77
3.3	结果和讨论	78
3.3.1	α -芋螺毒素 Vi I A 两种天然二硫键异构体的发现	78
3.3.2	O-超家族富含甘氨酸芋螺毒素 vi6a 的发现和溶液结构 测定	84
3.3.3	全新基因超家族 V-芋螺毒素 vi15a 的发现和 cDNA 克隆	95
3.3.4	处女芋螺毒液其他成分的分离纯化和性质鉴定	110
3.3.5	信号芋螺毒液成分的分离纯化和分子量鉴定	117
3.3.6	花玛瑙芋螺毒液成分的分离纯化和分子量鉴定	119
第 4 章	中国南海新型芋螺毒素的溶液结构和功能研究	122
4.1	概述	122
4.2	材料和方法	124
4.2.1	线形肽的固相化学全合成和体外氧化折叠	124
4.2.2	活体动物毒性实验	125
4.2.3	电生理	126
4.3	结果和讨论	127
4.3.1	$\alpha 4/4$ -芋螺毒素 Qc1.2 的功能研究	127
4.3.2	$\alpha 4/6$ -芋螺毒素 Vi I A-a 和 Vi I A-b 的功能研究	135
4.3.3	$\alpha 4/7$ -芋螺毒素 Lpl.1 和 Lpl.4 的功能研究	136
4.3.4	$\alpha 4/7$ -芋螺毒素 Mr1.1 的功能研究	145
4.3.5	framework 14 芋螺毒素 pul4a 的固相化学合成、体外 氧化折叠、溶液结构和功能研究	153
参考文献		163
后记		188

第1章

引言

芋螺毒素(conotoxin)是热带猎食性海洋生物芋螺毒液管壁上皮细胞生产和分泌的一类具生物活性多肽,具有分子量小、富含二硫键、序列高度多样化和作用靶点广泛等特点,能特异性地作用于细胞膜上的配体门控离子通道,如烟碱型乙酰胆碱受体,钠、钾、钙等多种电压门控型离子通道,神经递质激肽受体和 G 蛋白偶联受体。芋螺毒素不仅可以作为研究离子通道和神经递质受体的有利工具,也可直接被开发为药物或新药先导化合物,具有广泛的应用范围和良好的应用前景。

1.1 芋螺的生物学

芋螺(genus *Conus*)属于腹足纲软体动物,因其外形多呈圆锥或芋头形而得名。芋螺多数生活在热带海洋中的浅水区,少数生活在水深几十米至 200 余米的区域,白昼或退潮后在海藻下或珊瑚洞中栖息,夜晚外出觅食,春夏繁殖。目前发现的芋螺约有 700 种,不同物种芋螺的外形、花纹、色泽和塔高等都有明显差异,故动物分类学家们常以此命名。我国的芋螺资源主要分布在海南、广东、广西和台湾诸省(区)及西沙和南沙群岛等热带海域。

芋螺利用其毒液管中的活性物质为主要武器,干扰细胞或神经元中的信号传递,从而进行捕食、防御猎食者和威慑竞争者。芋螺虽然种类繁多,个体大小和食物种类(5 种不同门)各异,但都是食肉动物。根据芋螺的食性可将其分为 3 类:食虫芋螺(vermivorous)数量最多,约占全部芋螺物种的 70%;其次是食其他软体动物芋螺(molluscivorous);而食鱼芋螺(piscivorous)的数量最少但毒性最大^[1]。芋螺具有构造精细的毒器装置,包括毒囊泡、毒液管、齿舌