

短链蝎毒素 *BmK38* 的¹H-NMR 谱峰归属、 二级结构分析及溶液构象*

蔡征¹, 许琛琦², 吴季辉¹, 徐应祺¹, 戚正武^{2,3}, 施蕴渝¹

(1. 中国科学技术大学生命科学学院结构生物学开放实验室, 安徽合肥 230027;

2. 中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031; 3. 同济大学蛋白质研究所, 上海 200092)

摘要: *BmK38* 是最近从东亚钳蝎 (*Buthus martensi Karsch*, *BmK*) 中分离纯化得到的一种短链蝎毒素. 应用 2D-NMR 技术研究 *BmK38* 的溶液构象, 通过分析其在水溶液中的 DQF-COSY、TOCSY 和 NOESY 等¹H-NMR 谱, 识别了 *BmK38* 全部 40 个氨基酸残基的自旋体系, 并通过分析 NOESY 谱图中 $d_{\alpha N}$ 、 d_{NN} 、 $d_{\beta N}$ 的联系, 完成了序列专一性谱峰归属, 标定了全部主链质子和绝大部分侧链质子的化学位移. 根据谱峰归属的结果和 NMR 数据分析了 *BmK38* 的二级结构组成并且计算出 *BmK38* 的溶液构象. 结构计算的结果与前述二级结构的分析是一致的. 结果表明, 肽段 Gln8~Arg17 形成 α 螺旋, 而肽段 Gly22~Glu29 以及 Leu32~CYS39 构成反平行的 β 折叠, 属于典型的短链蝎毒素的折叠形式. 通过与其他 α -KTx 短链蝎毒素的结构比较, 讨论了 *BmK38* 的结构特异性以及结构功能的相互关系.

关键词: 短链蝎毒素; 二维核磁共振; 序列专一性归属; 二级结构; 溶液构象

中图分类号: Q71 文献标识码: A

Sequence-specific assignments of proton NMR resonance peaks, analysis of secondary structural elements and solution conformation of *BmK38*

CAI Zheng¹, XU Chen-qi², WU Ji-hui¹, XU Ying-qi¹, QI Zheng-wu^{2,3}, SHI Yun-yu¹

(1. Laboratory of Structural Biology, School of Life Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China;

2. Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China;

3. Institute of Protein Research, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: *BmK38* is a novel 40-amino acid residue peptide identified from the venom of Chinese scorpion *Buthus martensi Karsch*. The primary sequence analysis of *BmK38* shows that it is a cysteine-rich peptide, and the number of residues between the fourth and the fifth cysteine residue is much bigger than that of other α -KTx toxins. Its theoretical MW and theoretical PI are 4 558 and 8. 64, respectively. *BmK38* was synthesized on Boc-Lys(2ClZ)-OCH₂-PAM resin using a custom-modified, machine-assisted chemistry

* 收稿日期: 2004-09-08; 修回日期: 2005-10-28

基金项目: 国家重大基础研究发展计划(G1999075605, 2002CB713806), 国家自然科学基金(30270293, 30170210), 国家自然科学基金创新研究群体(30121001), 国家科技攻关计划("863"重点)(2002BA711A13), 中国科学院知识创新重大项目(KSCX1-SW-17)资助.

作者简介: 蔡征, 男, 1978 年生, 博士. E-mail: caizheng78@ustc.edu

通讯作者: 施蕴渝, 院士. E-mail: yyshi@ustc.edu.cn; Tel: 0551-3607464

tailored from the published in situ DIEA neutralization/HBTU activation protocol for Boc solid phase peptide synthesis and then purified by reversed-phase HPLC to homogeneity. In order to investigate the structure-function relationship, two dimensional homonuclear ^1H NMR technique was used to determine the structure of *BmK38*. By means of two-dimensional DQF-COSY, TOCSY and NOESY spectroscopies, spin systems of all 40 residues were identified. Then the sequence-specific assignment was completed by analyzing the $d_{\alpha\text{N}}$, d_{NN} and $d_{\beta\text{N}}$ connectivities. The chemical shifts of all the backbone protons and most of the side-chain protons were subsequently identified. Both the $d_{\alpha\text{N}}$, d_{NN} and $d_{\beta\text{N}}$ connectivities and the chemical shift index (CSI) data show that *BmK38* forms a typical α/β scaffold adopted by most short-chain scorpion toxins. At last, the solution structure was determined by using the standard simulated annealing and energy minimization protocols. The results show that the secondary structure of *BmK38* consists of a two-stranded antiparallel β -sheet from residues 22~39, and an α -helix from residues 8~17. The structure comparison of *BmK38* with other α -KTx toxins, especially the unique β -turn, may provide an explanation of the pilot study of its physiological function.

Key words: *BmK38*; short-chain scorpion toxin; 2D-NMR; sequence-specific assignment; secondary structural elements; solution structure

0 引言

钾通道在很多生理学过程中起很重要的作用, 这些过程包括细胞兴奋性, 神经递质释放, 荷尔蒙分泌, 信号传导, 细胞大小调节等等^[1]. 近年来, 虽然人们已经研究获得了很多关于钾通道的知识(尤其是结构生物学的信息)^[2,3], 但是关于钾通道在特定细胞中如何发挥生理学的功能, 仍然研究不够. 为了研究这个含有超过 80 个成员的大型亚家族^[4], 我们必须找到特定的研究探针来做针对性的研究.

研究证明, 蝎毒素是一类研究钾通道的药理学特性、结构特性以及功能特性的强大工具. 大多数作用于钾通道的蝎毒素是由 23~47 个氨基酸残基组成的短链肽类, 含有 3~4 对稳定结构的二硫键. 这一类蝎毒素都由一段 α 螺旋通过高度保守的二硫键连接在一个两段或者三段折叠片形成的 β 折叠上, 形成同样的一类结构骨架^[5]. 东亚钳蝎 (*Buthus martensi* Karsch, *BmK*) 广泛分布在韩国、蒙古和中国境内, 是应用了几千年的、很重要的中药药材之一. *BmK* 不是危险的蝎类, 近几年来, 对 *BmK* 毒素的研究进展迅速, 发现了很多新的 *BmK* 毒素, 已有超过 20 个作用于不同的钾通道亚型的 *BmK* 毒素得到了纯化和鉴定^[6].

BmK38 是最近从 *BmK* 中分离纯化得到的一种短链蝎毒素, 它由 40 个氨基酸残基组成, 理论相对分子量为 4 558, 理论等电点为 8.64.

从一级结构看, *BmK38* 和其他的短链蝎毒一

样, 都是 CYS 富集的, 另外含有 3 个芳香族氨基酸残基(2 个 TYR 和 1 个 PHE) 和 6 个碱性残基(4 个 Lys 和 2 个 Arg). 更重要的是, 从图 1 的 *BmK38* 与已知 19 类 α -KTx 短链蝎毒素的一级序列比较可知, *BmK38* 的一级序列与已知 19 类 α -KTx 短链蝎毒素有很大的不同; *BmK38* 在第四个半胱氨酸和第五个半胱氨酸之间的残基数(12 个)要远多于另外 19 个亚家族的相应位置的残基数; 而这一段就是同源的其他的短链蝎毒的 C 端的 β 转角区, 有文献研究表明这个 β 转角对毒素的通道亚型专一性非常关键, 例如 IbTx 的 G30 是决定它只对 BK 通道专一的关键残基^[7], 它就位于这个转角上. 因此, 研究毒素 *BmK38* 的三维结构, 对于研究短链蝎毒素的一级序列与三维结构的关系以及进一步研究其结构功能关系, 具有很重要的理论意义.

为了探求这个全新短链蝎毒素的结构特点以及与功能的联系, 我们应用二维核磁共振(2D-NMR) 技术进行了 *BmK38* 的溶液构象研究, 报道了 ^1H 谱峰的完全归属以及二级结构单元的分析结果. 我们相信, 对于蝎毒素的结构研究能够帮助阐明毒素的作用机理, 并且对药物设计以及干涉性治疗的研究具有重要意义^[8].

1 材料和方法

1.1 实验材料

BmK38 的化学合成: 在 Boc-Lys(2ClZ)-OCH₂-PAM 树脂上, 利用原位 DIEA 中和/HBTU

			10	20	30	40	50		
α -KTx 1.1 ChTx	24	---ZFTNVSC	TTSKECWS	VCQLRHH	-TSR	GKCMN	-----KKRCYS-	
α -KTx 2.1 NTx	20	---	TIINVKCT	SPKQCS	KPKELTGS	SAGAKCMN	-----	GKCKCYNN	
α -KTx 3.1 KTx	7	--GVE	INVKCS	GSPQCL	KPKCKDA	-G-MRF	GKCMN	-----RKCHCTPK	
α -KTx 4.1 TsII-9	24	---	VFINAKCR	GSPECL	PKCKEAI	G-KAAG	KCMN	-----GKCKCYP-	
α -KTx 5.1 LeTxI	25	-----	AFCNL	-RMCQL	SCRSLGL	--LGKCI	---G---	DKCECVKH	
α -KTx 6.1 Pi1	22	-----	LVKCRGT	SDCGR	PCQQQTG	-CPNS	SKCIN	-----RMCKCYGC	
α -KTx 7.1 Pi2	20	-----	TISCTNP	KQCYPH	CKKETG	-YPNA	KCMN	-----RKCKCFGR	
α -KTx 8.1 PO1	17	-----	VSCE	---DCPE	HCASTQ	KA---QAK	CDN	-----DKVCCEPI	
α -KTx 9.1 BmPO2	17	-----	VGCE	---ECP	MHCKG	KNA---KPT	ADD	-----GVCHCN-V	
α -KTx10.1 CoTx1	34	-----	AVCVY	-RTCD	KDKRR	GYR--SG	KCIN	-----NACKCYPY	
α -KTx11.1 PBTx1	10	--DEEP	KEKSCSD	-EMCVI	YCKGEEY	--STG	VCDGP	-----QKCKCSD-	
α -KTx12.1 TsTxIV	20	WCST	CLDLAC	GASRE	CDP	CFKAFG	-RAH	GKCMN	-----NKRCRYTH
α -KTx13.1 Tc1	39	-----	AC	---GSCR	RKCK	-----GSG	KCIN	-----GRCKCY--	
α -KTx14.1 BmKK1	9	---	TPFAIK	CATDAD	CSRKCP	GN-----	PSCRN	-----GFCACT--	
α -KTx15.1 BmTX3	27	--ZVET	NVKCQG	-GSCAS	VCRKAIG	-VAAG	KCIN	-----GRCVCYP-	
α -KTx16.1 tamapin	35	-----	AFCNL	-RRCEL	SCRSLGL	--LGKCI	---G---	EECKCVPY	
α -KTx17.1 BmKK4	20	-----	QTQCQ	SVRDC	QQYCLTP	-----	DRCSY	-----GTCYCKTT	
α -KTx18.1 Tc32	17	---	TGPQT	TCA-AM	CEAG	CKGLGK	--SM	ESQG	-----DTCKCKA-
α -KTx19.1 BmBKTx1	32	-----	AACYS	-SDCR	VKCV-AMG	-FSS	GKCMN	-----SKCKCYK-	
<i>BmK38</i>	100	---	KTATP	TQTQ	-SICQ	ESCKRQ	NK---N	GRCVIEAEGSLIYHLCKCY--	
subfamily	score		*	*	*	*	*	**	

图 1 *BmK38* 与已知 19 种 α -KTx 毒素的序列比对Fig. 1 Sequence alignment of *BmK38* with the 19 known α -KTx toxins

活化的方案在固相多肽合成仪上根据优化的传统方法完成^[9]. 链合成结束以后, 多肽被切下, 在 *p*-甲酚/硫代甲酚(1:1)存在下, 用 HF 去保护 1 h. 粗产物随后用 HPLC 纯化, 产物的相对分子量用 ESI 质谱鉴定. 纯化过的 *BmK38* 重新溶解到含有 18 mM 还原态谷胱甘肽和 1.8 mM 氧化态谷胱甘肽的 6 M 的盐酸胍中, 迅速用 0.25 M 的 NaHCO₃ 稀释 6 倍, 室温过夜自然配对二硫键. 最终的产物再次用 HPLC 纯化并冻干保存. 通过比较天然产物和化学合成产物的 HPLC 洗脱时间, 确认了化学合成产物和天然产物的二硫键配对是一致的.

纯化的蛋白干粉溶解在 450 μ L 含 10% D₂O 的水中, 加入 1 μ L 浓度为 100 mM 的 NaN₃ 以抑制细菌的生长; 将 pH 调至 5.0, 即得到水溶液核磁共振实验的样品, 样品终浓度约为 3 mM. 这份样品在记录完所需的谱图之后被冻干, 重溶于 99.96% 的 D₂O 中, 进行氘交换实验和重水中记录的实验.

1.2 实验方法

所有的 NMR 实验均用 Bruker DMX500 谱仪, 在 *z* 方向自屏蔽梯度下于 300 K 的温度下进行. 在水溶液样品中进行了常规的同核二维谱实验, 包括 TOCSY、DQF-COSY 和 NOESY; 采用 States-TPPI 方法实现 F1 维正交采样; 两维的采样点数通常为 512 \times 4 094; 实验的谱宽定为 12 ppm. TOCSY 实验

的混合时间是 73 ms, NOESY 实验的混合时间是 100 ms 和 200 ms. 为了减小零量子信号的干扰, 在 NOESY 实验中混合时间在 $\pm 10\%$ 范围内随机变动^[10]. 我们采用 WATERGATE 方法^[11] 和低功率的预饱和来抑制水峰.

为了找出分子内可能参与氢键形成的质子, 在 283 K 进行了氘交换实验. 水样品冻干后在冰浴中重溶解于预冷的重水, 立即转入 5 mm 样品管并且置入预先调整好状态的谱仪中, 简单匀场以后即开始检测氨基质子信号的消失情况. 前半小时用 1D 谱检测, 此后则用 TOCSY 检测, 实验的时间点分别为 0.5、1、1.5、2、3、4、6、8、12、16、20、24 h.

数据处理使用的是 Bruker 的 UXNMR 软件. 在傅立叶变换之前使用 SIN2 窗函数处理并且填零使两维都达到 2 048 个复数点; 傅立叶变化以后使用 FLATT 方法进行基线校正.

1.3 结构计算

用于结构计算的软件为 CNS (Crystallography & NMR System) 1.1^[12]. 结构计算的约束包括由 NOE 峰转化得到的质子间距离约束、从 J 耦合常数转化得到的二面角约束以及从氘交换实验中得到的氢键约束; *BmK38* 的三对二硫键在结构计算的后期阶段得到确认以后也被当做约束用于计算.

NOE 峰的积分值是利用 XEASY 中的矩形积

分方法获得;J 耦合常数利用整合在 XEASY 中的 INFIT 方法^[13]来选择 TOCSY 谱图中的孤立的强峰做拟合分析得到.通过比较 100 ms 和 200 ms 的 NOESY 谱图,发现 200 ms 时基本无自旋扩散现象,最后我们选择 100 ms 的 NOESY 谱图来获得交叉峰的积分强度.另外对于脂肪区一些只能在重水谱中分辨的交叉峰,通过比较其他在水谱图中也能很好分辨的交叉峰得出谱图之间的 scale 因子,从而得到相应侧链间的距离约束.从 NOE 强度到距离上限的转换是根据 r^{-6} 关系,按照 β 折叠中 $d_{\alpha N}$ 为 2.2 Å 左右 d_{NN} 为 3.3 Å 左右参照完成,然后对一些可能有交叉的和侧链之间的距离约束适当放松,对涉及甲基的约束放松 0.5 Å.

由 INFIT 方法得到的 $^3J_{HN\alpha}$ 被转化为主链 φ 角约束的数据: $-65^\circ \pm 25^\circ (< 6.5 \text{ Hz})$, $-120^\circ \pm 25^\circ (> 9 \text{ Hz})$, $-120^\circ \pm 35^\circ (> 8 \text{ Hz})$.

2 结果和讨论

2.1 自旋体系的识别

读谱选择 XEASY 软件^[14].顺序认证过程按照 Wüthrich 所发展的方法进行^[15].首先根据结构特征将 *BmK38* 的 40 个氨基酸残基分成 4 类自旋体系:AX 体系,包括 Gly;含有甲基因而有高场位移的

体系,包括 Ala、Thr、Val、Leu 和 Ile;AMX 体系,包括 Cys、Ser、Asn、His、Phe 和 Tyr;以及长链自旋体系,包括 Lys、Arg、Glu 和 Gln.然后通过 *BmK38* 的 DQF-COSY 谱指纹区(图 2)和 TOCSY 谱特征推测谱峰对应的自旋体系的类型,再结合 DQF-COSY 谱中各种自旋体系特有的耦合特征进一步确定自旋体系的类型.部分 AX 体系和含有甲基的残基体系等可以在此阶段得到归属,而 Ser 残基可以根据其 β 质子化学位移特别低场得以归属.另外,His 的芳环质子也可以根据其独特的自旋体系得以归属.这些已确定的残基将为下一步的序列专一性归属提供起点.图 3 显示了除第一个残基 Lys1 之外的其余 39 个氨基酸残基的自旋体系.其中大部分自旋体系的识别是与序列专一性归属结合进行.

2.2 序列的专一性归属

通过分析 NOESY 谱进行序列专一性归属.利用前面自旋体系归属已识别的残基作为序列识别的起点,通过寻找 $d_{\alpha N}$ 、 $d_{\beta N}$ 、 d_{NN} 等序列 NOE 联系,按照 *BmK38* 肽链的一级序列将自旋体系连接起来,见图 4.如果在观察到 $d_{\alpha N}$ NOE 的同时,还能观察到 $d_{\beta N}$ 或 d_{NN} ,而且残基的自旋体系类型也已明确归属,则该序列连接可以得到确认.再综合利用排除

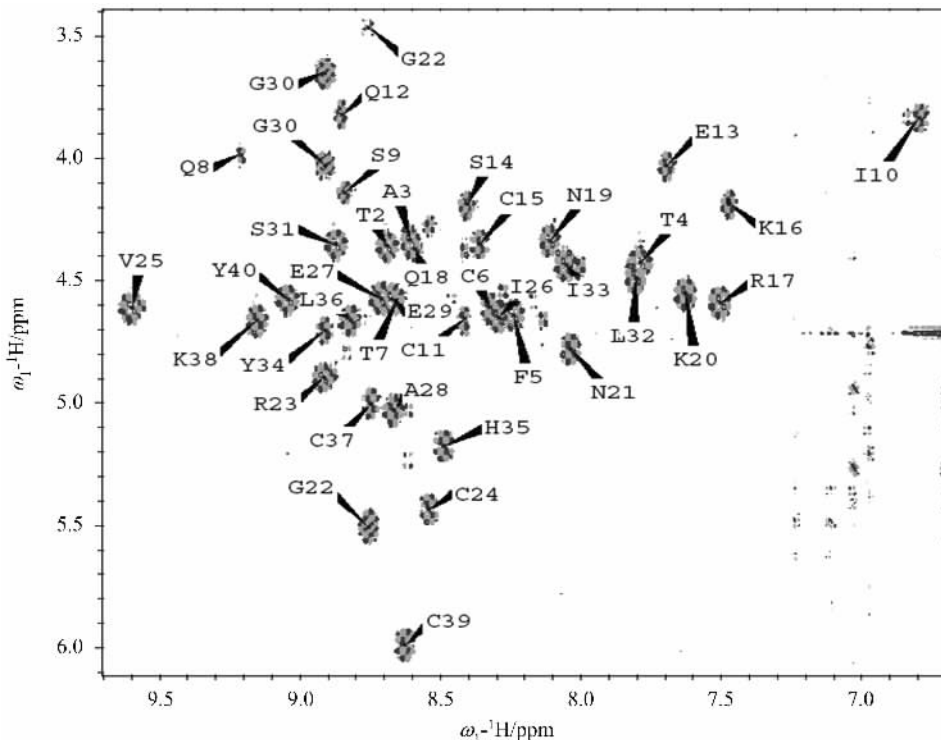


图 2 *BmK38* 在水中的 DQF-COSY 谱图的指纹区

Fig. 2 Fingerprint region of DQF-COSY spectrum in H_2O recorded for *BmK38*

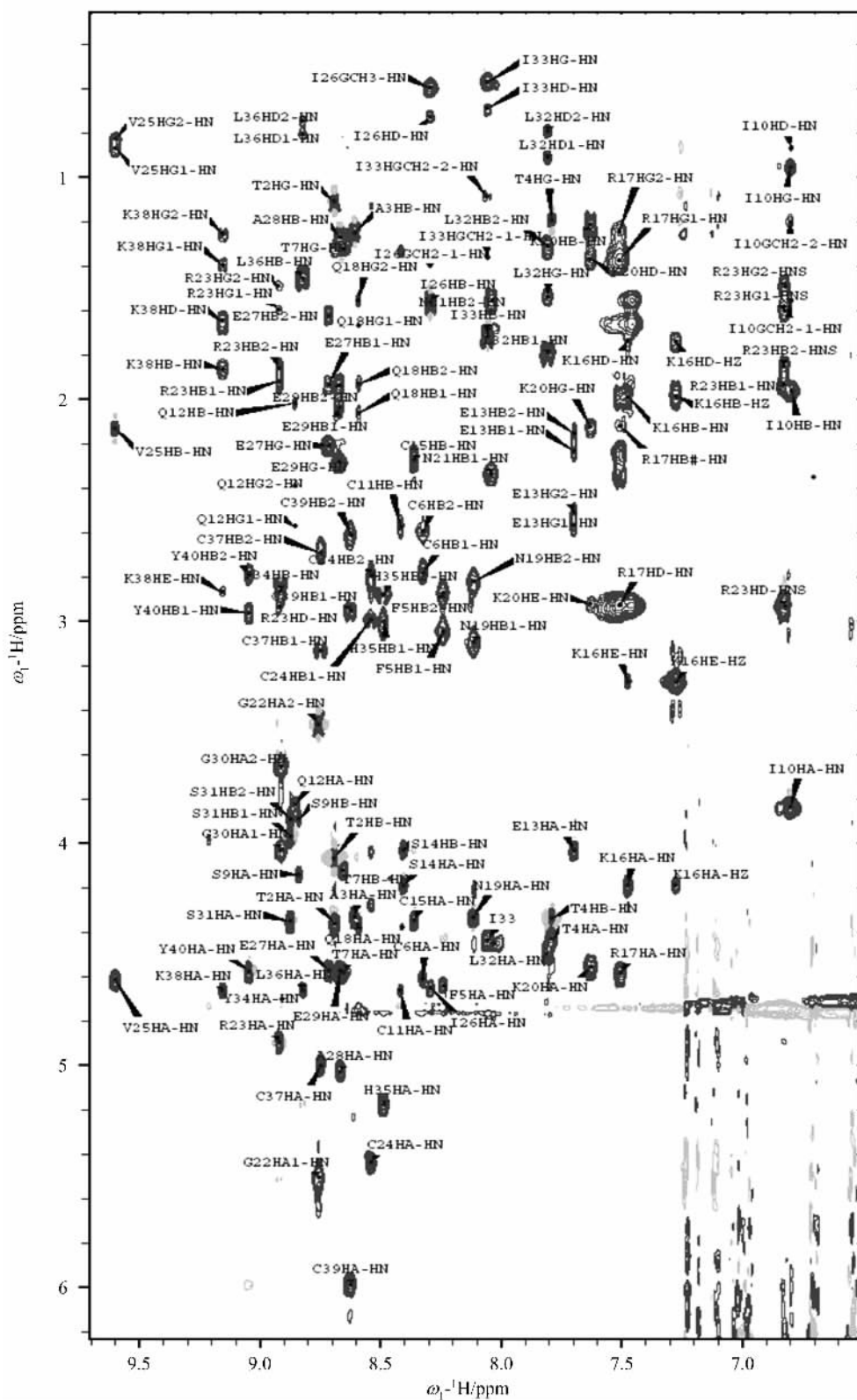


图 3 *BmK38* 在水中的 TOCSY 谱图,混合时间 73 ms,标注了得到认证的 39 个(除第一个外)氨基酸残基脂肪链质子与 NH 质子的交叉峰

Fig. 3 NH-aliphatic region of 500-MHz TOCSY spectrum for *BmK38* with $\tau_m = 73$ ms in H_2O , identifying the cross-peaks of the 39 (except the first one) assigned amino acids of *BmK38*

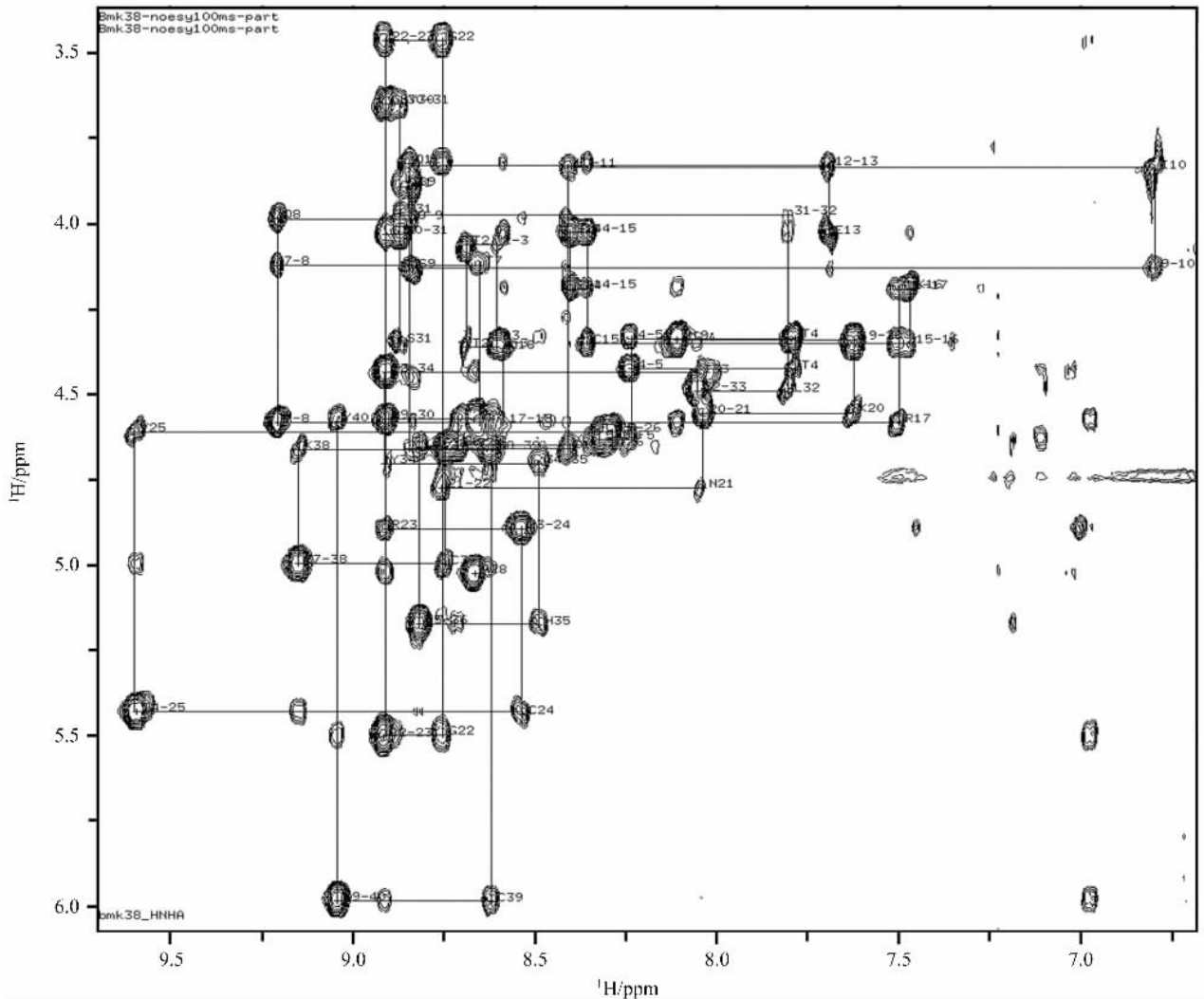
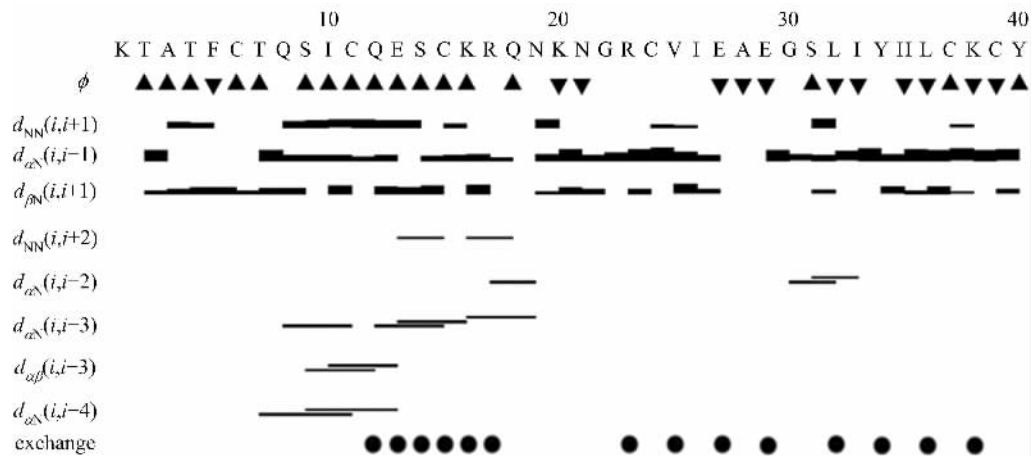


图 4 *BmK38* 在水中的 NOESY 谱图,混合时间 100 ms(图中实线标注了 NOE 交叉峰的序列连接)

Fig. 4 Fingerprint region of 500 MHz NOESY spectrum of *BmK38* with $\tau_m = 100$ ms in H_2O
(The NOE sequential walk is indicated by solid lines)



The height of the bars indicates the intensity of corresponding NOEs, ▲, $\varphi = 65^\circ \pm 25^\circ$; ▼, $\varphi = 120^\circ \pm 25^\circ$ based on the $^3J_{HNH_\alpha}$ values via the INFIT routine. The H-D exchange experiments were performed at 283 K

图 5 序列 NOE 连接概要图(横线的宽度代表相应 NOE 的强度)

Fig. 5 Summary of sequential NOE connections

法,可以得到确定序列专一性连接结果. *BmK38* 的所有 $d_{\alpha\text{N}}$ 、 $d_{\beta\text{N}}$ 、 d_{NN} 等序列 NOE 连接的总结如图 5 所示.

由序列连接进一步确定了自旋体系的归属, *BmK38* 全部主链和绝大部分侧链的质子均得到归

属,表 1 列出了它们的化学位移. 其中 PHE、TYR 和 HIS 芳香环上的 H 归属主要是通过残基的 β 质子与芳香环上临近 H 的 NOE 联系,以及芳香环上各 H 之间的 COSY 交叉峰来确定的.

表 1 *BmK38* 的质子的化学位移
Tab. 1 ^1H chemical shifts of *BmK38*

No.	name	HN	HA	HB	others
1	LYS	—	4.08	1.89	HG 1.41; HD 1.67; HE 2.96
2	THR	8.69	4.36	4.07	HG 1.09
3	ALA	8.61	4.33	1.25	—
4	THR	7.79	4.43	4.34	HG 1.19
5	PHE	8.24	4.64	3.05/2.87	26H 7.11; 35H 7.24; 4H(overlap)
6	CYS	8.32	4.61	2.78/2.59	—
7	THR	8.66	4.58	4.12	HG 1.32
8	GLN	9.21	3.99	2.20/2.04	HG 2.48/2.33
9	SER	8.84	4.14	3.89	—
10	ILE	6.8	3.84	1.96	HG1 1.56/1.20; HG2 0.95; HD 0.87;
11	CYS	8.42	4.66	2.57	—
12	GLN	8.85	3.82	2.02	HG 2.57/2.39
13	GLU	7.7	4.03	2.23/2.15	HG 2.57/2.51
14	SER	8.4	4.19	4.03	—
15	CYS	8.36	4.35	2.27	—
16	LYS	7.47	4.19	1.99	HD 1.74; HE 3.27; HZ 7.27
17	ARG	7.51	4.59	2.12	HG 1.37/1.24; HD 2.92
18	GLN	8.59	3.82	2.06/1.92	HG 1.66/1.55
19	ASN	8.11	4.33	3.09/2.82	—
20	LYS	7.63	4.56	1.21	HG 2.12; HD 1.37; HE 2.92
21	ASN	8.04	4.78	2.34/1.56	—
22	GLY	8.76	5.51/3.46	—	—
23	ARG	8.92	4.9	1.92/1.86	HG 1.60/1.49; HD 2.93; HE 6.83
24	CYS	8.54	5.43	2.99/2.80	—
25	VAL	9.6	4.61	2.13	HG 0.84
26	ILE	8.29	4.65	1.56	HG1 1.40/0.59; HD 0.73; HG2 0.60
27	GLU	8.71	4.57	1.93/1.62	HG 2.21
28	ALA	8.67	5.03	1.27	—
29	GLU	8.67	4.57	2.04/1.94	HG 2.28
30	GLY	8.91	4.03/3.65	—	—
31	SER	8.87	4.35	3.97/3.89	—
32	LEU	7.81	4.49	1.79/1.31	HG 1.54; HD 0.91/0.79;
33	ILE	8.06	4.44	1.71	HG1 1.37/1.08; HD 0.70; HG2 0.57
34	TYR	8.91	4.7	2.86/2.86	26H 7.03; 35H 6.70
35	HIS	8.49	5.17	3.01/2.88	2H 8.64; 4H 7.18
36	LEU	8.82	4.66	1.46	HG 1.46; HD 0.81/0.75
37	CYS	8.75	5.00	3.13/2.69	—
38	LYS	9.15	4.66	1.86	HG 1.39/1.25; HD 1.64; HE 2.87
39	CYS	8.62	5.99	2.95/2.61	—
40	TYR	9.05	4.58	2.96/2.79	26H 6.97; 35H 6.54

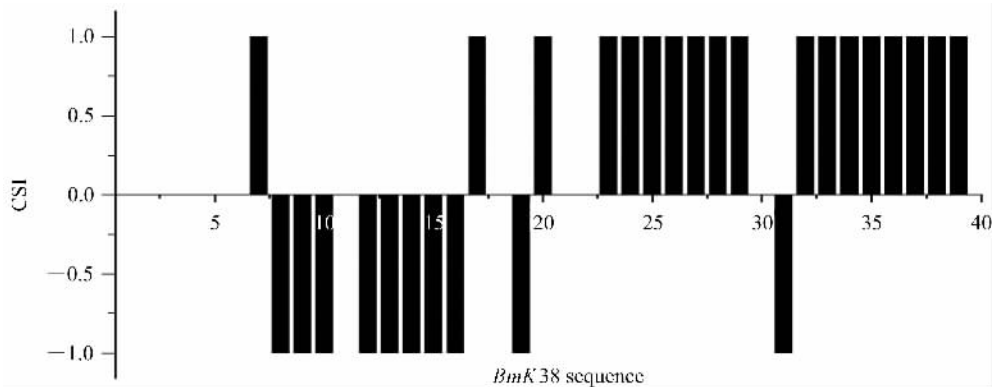


图 6 *BmK38* 残基的 CSI 值分布

Fig. 6 The CSI value of *BmK38*

2.3 *BmK38* 的二级结构分析

由图 5 可以看出在肽段 8~16 的序列 NOE 连续出现很强的 d_{NN} 和较弱的 $d_{\alpha\text{N}}$, 表明这一肽段可能存在螺旋构象. 而且这一肽段的氨基酸残基的 $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ 耦合常数均小于 6 Hz (数据未显示), 这也表明这些肽段可能为螺旋构象. 这说明 $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ 耦合常数的分析和序列 NOE 强度的分析结果是一致的. 由图 5 还可以看出, 氨基酸肽段 19~26, 29~40 的序列 NOE 连续出现的是较弱的 d_{NN} 和较强的 $d_{\alpha\text{N}}$, 表明这些肽段可能存在 β 折叠或者是伸展构象.

统计数据表明, 在无规则卷曲状态下氨基酸残基 C_αH 的化学位移相比, 规则结构如螺旋结构中氨基酸的 C_αH 的化学位移平均向高场移动 0.39 ppm; β 折叠和伸展结构中 C_αH 的化学位移平均向低场移动 0.37 ppm. C_αH 的化学位移的偏移可以直观地用 CSI (chemical shift index) 显示^[16]. 图 6 显示了 *BmK38* 的 CSI 数据, 由图 6 可见, *BmK38* 分子中肽段 8~16 连续显示 -1 的 CSI, 而肽段 22~29 与肽段 32~39 均连续显示 +1 的 CSI, 这说明在肽段 8~16 可能存在螺旋构象, 而肽段 22~29 与肽段 32~39 可能存在 β 折叠或者是伸展构象, 这个结果进一步验证了前述的二级结构分析结果.

进一步分析肽段间的长程 NOE 时发现, 除了重叠在一起不可以确定区分的 NOE 交叉峰之外, 仍然在 8~11, 10~13, 12~15 以及 13~16 之间存在 $\text{H}_i-\text{HN}_{i+3}$ 之间的 NOE 交叉峰, 再结合 d_{NN} 和 $d_{\alpha\text{N}}$ 强度比较分析、 $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ 耦合常数的分析和 CSI 分析, 可以确定在 Gln8~Lys16 这个肽段存在 α 螺旋. 另外, 在重水交换实验中发现残基段 12~16 的氨基质子属于慢交换, 说明这一段的氨基质子可能参与形成了氢键, 这与上述的结论是一致的. 另外, 在肽

段 22~29 以及 32~39 之间存在有规律的长程 NOE ($23\text{HN}\sim 39\text{H}\alpha$, $24\text{H}\alpha\sim 38\text{HN}$, $25\text{HN}\sim 37\text{H}\alpha$, $27\text{HN}\sim 35\text{H}\alpha$, $28\text{H}\alpha\sim 34\text{HN}$ 以及 $29\text{HN}\sim 33\text{H}\alpha$), 这是明显的反平行 β 折叠的特点; 同样再结合 d_{NN} 和 $d_{\alpha\text{N}}$ 强度比较分析、 $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ 耦合常数的分析和 CSI 分析, 可以确定在 Gly22~Glu29 以及 Leu32~CYS39 两个肽段之间存在反平行的 β 折叠. 而 Gly30 和 Ser31 都是容易形成 β 转角的残基. 另外, 在重水交换实验中发现残基 23, 25, 27, 29, 32, 34, 36, 38 的氨基质子属于慢交换, 说明这几个残基的氨基质子可能参与形成了氢键, 这与上述关于这一肽段二级结构的结论是一致的. 这些结果说明, *BmK38* 和其他短链蝎毒素类似, 是由靠近 N 端的一段 α 螺旋和 C 端的一段 β 折叠一起形成的 CS- $\alpha\beta$ 折叠形式.

2.4 结构计算

12 h 以后仍然没有消失的氨基质子被认为是慢交换的, 它们可能与氢键的形成有关. 在我们的实验中观察到, *BmK38* 的第 12~17 和 23, 25, 27, 29, 32, 34, 36, 38 个残基的氨基质子在氘气交换 12 h 之后的 TOCSY 谱图中仍明显存在. 对 NOE 分布、J 耦合、化学位移的分析揭示在第 8~16 个残基之间形成 α 螺旋结构 (图 5), 于是确定 12, 13, 14, 15, 16 的氨基质子分别与 8, 9, 10, 11, 12 的 CO 形成氢键. 于是我们在结构计算中加入了这 5 个氢键约束. 数据分析还可以揭示在第 22~39 个残基之间形成了 β 折叠的结构, 于是可以根据氘气交换的结果推出分别第 23 与 38, 25 与 36, 27 与 34, 29 与 32 个残基之间存在氢键. 这两个氢键也被作为约束加到后面的计算当中. *BmK38* 的三对二硫键在结构计算的后期阶段得到确认以后也被当做约束用于计算.

最终的约束包括 167 个残基内、102 个相邻残基间、35 个中程的及 52 个长程的距离约束(共 356 个);29 个二面角约束、14 个氢键得到的 28 个距离约束和三对二硫键的约束。

结构计算在 CNS 软件中进行^[12]。我们所采用的计算方案是从 Stein 等的方案演化过来的^[17]，具体方案可参考 Cai 等发表的论文^[18]。

最终计算结果从 50 个算出的接受的结构中按照能量排序挑选 20 个，加上它们的平均构象做能量优化后的结构，作为 *BmK38* 的溶液构象集。所有这些结构很好的满足约束，对距离约束的 violation 不大于 0.3 Å，对二面角的约束不超过 5°。对几何约束的 violation 都很小。没有非键原子的重叠，范德华作用项为负值，并且在使用完整的非键相互作用势做 100 步能量优化后可以大大减小。

最终的分子结构除了 N 末端 6 个残基之外，具有稳定二级结构的部分即肽段 7~40 相对于平均结构的主链 rmsd 为 0.55 ± 0.20 Å；所有重原子的 rmsd 是 1.38 ± 0.24 Å。

图 7 显示了结构计算的结果，*BmK38* 和其他短链蝎毒素一样，由一段 α 螺旋(残基 8~17)通过两对二硫键连接在一段反平行的 β 折叠(残基 22~39)上面形成典型的 $\text{CS-}\alpha\beta$ 折叠。 β 折叠是右手螺旋形式的。 α 螺旋与 β 折叠区域都被约束得很好。

2.5 结构功能关系分析

BmK38 和其他蝎钾离子通道毒素具有相同的半胱氨酸骨架^[5]，而且三维结构的骨架也十分吻合，由此可以推测该毒素也应是一个钾离子通道的毒素。本文运用一个全细胞系统(蝗虫背根未配对神经元系统)检测了 *BmK38* 对各类离子通道的活性，而且用爪蟾卵母细胞和 HEK293 细胞表达了数种电压门控型钾通道和钙激活型钾通道，并检测了毒素对它们的活性。然而无论是天然细胞上的各类钾通道亚型还是异源表达的各类钾通道亚型对 *BmK38* 都不敏感。因此需要用其他的系统对其功能进行检测，同时本文推测 *BmK38* 的真正靶点可能是某种尚未鉴定的钾通道亚型。

通过与其他已知 19 个 $\alpha\text{-KTx}$ 短链蝎毒素亚家族的结构相比较，发现 *BmK38* 的 C 端的 β 折叠的长度比其他短链蝎毒素都要长很多。在一级序列上，*BmK38* 的第四个半胱氨酸和第五个半胱氨酸之间(C 端 β 转角处)的残基数也比其他短链蝎毒素要多很多，而这一段多出的部分通过以上的分析与计算，

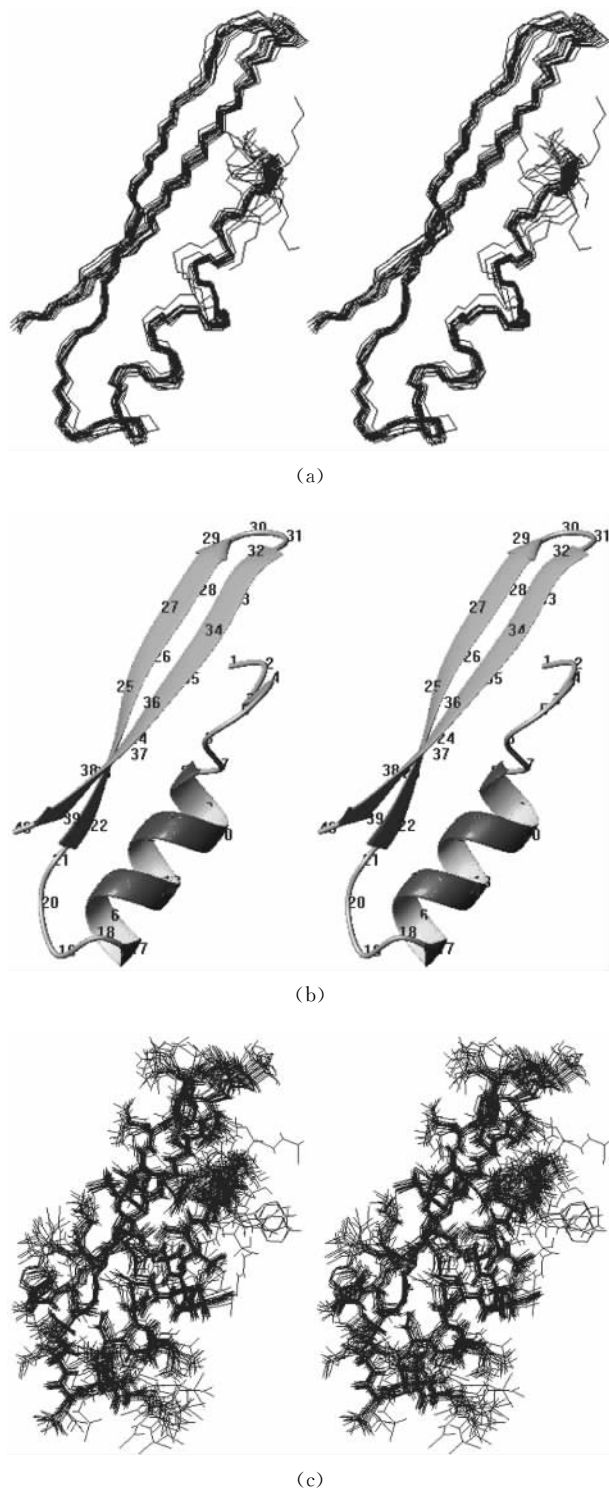


图 7 *BmK38* 溶液构象的主链叠合图(a)、平均构象的条带示意图(b)与全原子叠合图(c)

Fig. 7 Stereoview of the backbone superimposition of the 20 models for *BmK38* (a), the ribbon representation of the minimized average structure of *BmK38* (b), and the all atoms superimposition of the 20 models for *BmK38* (c)

在二级结构上可以确定为反平行 β 折叠. 这也使得整个毒素分子的长度要比其他短链蝎毒素要长很多. 从 *BmK38* 的结构特异性尤其是这个特异的 β 转角来看, 由于文献报道这个 β 转角对毒素的通道亚型专一性非常关键^[7], 所以上述的 *BmK38* 初步功能实验结果也是可以理解的. 由于 *BmK38* 在结构上与常规的电门控型钾通道蝎毒素和钙激活型钾通道蝎毒素有很大的差异, 所以对 *BmK38* 未来的功能实验以及结构功能关系研究具有重要的意义.

3 结论

综上所述, 本文报道了应用 2D-NMR 技术研究 *BmK38* 的溶液构象的初步结果, 识别了 *BmK38* 全部 40 个氨基酸残基的自旋体系, 完成了序列专一性谱峰归属, 标定了全部主链质子和绝大部分侧链质子的化学位移. 数据分析表明 *BmK38* 的二级结构由两部分组成, 其中肽段 Gln8~Lys16 是螺旋构象, 而肽段 Gly22~Glu29 以及 Leu3~CYS39 构成反平行的 β 折叠, 属于典型的短链蝎毒素的折叠形式. 这些分析结果与我们结构计算的初步结果是完全一致的(图 7); 而对于精细三维结构的认识, 有待进一步结构计算的结果, 这部分工作仍然在进行中. 另外, 通过分析 *BmK38* 的结构特异性尤其是它的特异的 β 转角结构, 分析了初步功能实验的结果, 并且推测 *BmK38* 的真正靶点可能是某种尚未鉴定的钾通道亚型.

参考文献(References)

- [1] Coetzee W A, et al. Molecular and functional diversity of ion channels and receptors[J]. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1999, 868:233-285.
- [2] Jiang Y, Lee A, Chen J, et al. X-ray structure of a voltage-dependent K^+ channel[J]. *Nature*, 2003, 423(6935):33-41.
- [3] Starace D M, Bezannilla F. A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field. *Nature*, 2004, 427(6974):548-553.
- [4] Wickenden A. K^+ channels as therapeutic drug targets [J]. *Pharmacol Ther.*, 2002, 94(1/2):157-182.
- [5] Rodriguez de la Vega R C, Merino E, Becerril B, Possani L D. Novel interactions between K^+ channels and scorpion toxins[J]. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2003, 24: 222-227.
- [6] Goudet C, Chi C W, Tytgat J. An overview of toxins and genes from the venom of the Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch [J]. *Toxicon*, 2002, 40(9):1 239-1 258.
- [7] Schroeder N, Mullmann T J, Schmalhofer W A, et al. Glycine 30 in iberiotoxin is a critical determinant of its specificity for maxi-K versus Kv channels[J]. *FEBS Lett*, 2002, 527(1/3):298-302.
- [8] Menez A. Functional architectures of animal toxins; a clue to drug design? [J]. *Toxicon*, 1998, 36, 1 557-1 572.
- [9] Schnolzer M, Alewood P, Jones A, et al. In situ neutralization in Boc-chemistry solid phase peptide synthesis: Rapid, high yield assembly of difficult sequences[J]. *Int J Pept Protein Res*, 1992, 40: 180-193.
- [10] Macura S, Huang Y, Suter D, et al. Two-dimensional chemical exchange and cross-relaxation spectroscopy of coupled nuclear spins[J]. *J Magn. Reson*, 1981, 43: 259-281.
- [11] Piotto M, Saudek V, Sklenar V. Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions[J]. *J Biomol. NMR*, 1992, 2:661-665.
- [12] Brünger A T, Adams P D, Clore G M, et al. Crystallography & NMR System: A new software suite for macromolecular structure determination [J]. *Acta Crystallogr.*, 1998, D54:905-921.
- [13] Szyperski T, Gntert P, Otting G, et al. Determination of scalar coupling constants by inverse Fourier transformation of in-phase multiplets [J]. *J Magn. Reson.*, 1992, 99:552-560.
- [14] Bartels C, Xia T H, Billeter M, et al. The program XEASY for computer-supported NMR spectral analysis of biological macromolecules [J]. *J Biomol. NMR*, 1995, 5:1-10.
- [15] Wüthrich K. In *NMR of Proteins and Nucleic Acids* [M]. New York: John Wiley & Sons, 1986.
- [16] Wishart D S, Sykes B D, Richards F M. The Chemical shift index: A fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy [J]. *Biochemistry*, 1992, 31(6): 1 647-1 651.
- [17] Stein E G, Rice L M, Brünger A T. Torsion-Angle molecular dynamics as a new efficient tool for NMR structure calculation [J]. *J Magn. Reson*, 1997, 124: 154-164.
- [18] Cai Z, Xu C, Xu Y, et al. Solution structure of *BmBKTx1*, a new BK_{Ca} channel blocker from the Chinese scorpion *Buthus martensi* Karsch [J]. *Biochemistry*, 2004, 43(13):3 764-3 771.