文章编号:1000-5404(2014)10-1055-04

论著

尖吻蝮蛇AaHⅣ催化结构域和非催化结构域免疫保护性比较

张 雷,曹宇亮,刘明华 (400038 重庆,第三军医大学西南医院急救部)

[摘要] **目的** 表达尖吻蝮蛇出血性P-Ⅲb型金属蛋白酶AaHⅣ催化结构域和非催化结构域,并鉴定其免疫小鼠后抗体的中和保护性。**方法** 采用基因合成的方法合成尖吻蝮蛇P-Ⅲ6型金属蛋白酶AaHⅣ的催化结构域和非催化结构域cDNA,分别重组在质粒pET28a(+)上,转入BL21(DE3)中表达,产物经亲和层析纯化。昆明小鼠随机分为催化结构域蛋白免疫组、非催化结构域蛋白免疫组、AaHⅣ免疫组、PBS免疫组,每组6只[4周龄,体质量(20±2)g,雌雄各半],3次免疫后分离血清,与AaHⅣ体外孵育后行出血中和实验。**结果** ELISA显示重组表达的AaHⅣ催化结构域和非催化结构域均具有免疫原性。出血中和实验显示:催化结构域免疫组和非催化结构域免疫组均较PBS免疫组显著减少出血面积($P<0.05$);AaHⅣ免疫组与催化结构域免疫组之间无统计学差异($P>0.05$),而与非催化结构域免疫组之间存在统计学差异($P<0.05$)。**结论** AaHⅣ催化结构域免疫小鼠产生的抗体在中和AaHⅣ出血毒性方面效果更为显著。

[关键词] 尖吻蝮蛇;蛇毒金属蛋白酶;SVMPs;催化结构域;非催化结构域
[中图法分类号] R345;R392.13;R996.3 [文献标志码] A

Expression, purification and immunoprotection analysis of catalytic domain and non-catalytic domain of AaHIV from *Agkistrodon acutus*

Zhang Lei, Cao Yuliang, Liu Minghua (Department of Emergency, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To express the catalytic domain and non-catalytic domain of AaHIV from *Agkistrodon acutus*, and analyze the immunoprotective effects in mice. **Methods** The catalytic domain and non-catalytic domain cDNA of AaHIV from *Agkistrodon acutus* were synthesized and cloned into pET28a(+) vector, respectively. The recombinant plasmids were transferred into *E. coli* BL21(DE3). Expression products were finally purified by affinity chromatography. Kunming mice were randomly divided into 4 groups ($n=6$, 4 weeks, 20±2 g, male/female ratio=1∶1), including a catalytic domain group, a non-catalytic domain group, an AaHIV group and a PBS group. After the third round of immunization, the antiserum was obtained. Titer was determined by ELISA and the protective effect of antiserum was analyzed by hemorrhagic activity test after neutralization of AaHIV. **Results** Both of the 2 recombinant fragments of AaHIV had immunogenicity. Neutralization test showed that as compared to the PBS group, the catalytic domain group and the non-catalytic domain group both showed significantly reduced subcutaneous hemorrhage ($P<0.05$). The subcutaneous hemorrhage area of the AaHIV group was significantly different from that of the non-catalytic domain group ($P<0.05$) but not from that of the catalytic domain group ($P>0.05$). **Conclusion** The antiserum induced by the catalytic domain of AaHIV from *Agkistrodon acutus* can more effectively neutralize the hemorrhagic activity of AaHIV.

[**Key words**] *Agkistrodon acutus*; snake venom metalloproteinase; SVMPs; catalytic domains; non-catalytic domains

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China(81071537), the Foundation for Sci & Tech Research Project of Chongqing (CSTC\20105026), the Foundation of the Innovative Scientific Research of Third Military Medical University (2009XLC15). Corresponding author: Liu Minghua, E-mail: mhliu4cq@aliyun.cn

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81071537);重庆市科技攻关计划(CSTC20105026);第三军医大学临床科研课题(2009XLC15)
[通信作者] 刘明华,E-mail:mhliu4cq@aliyun.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140102.1429.010.html (2014-1-2)

抗蛇毒血清是唯一有特效的治疗毒蛇咬伤的药物。然而,目前世界范围内的抗蛇毒血清都是通过“全蛇毒”对马、绵羊或者驴超免获得的[1],由于蛇毒中包含的毒素多样性,使得抗蛇毒血清的生产及其质量存在许多问题:生产周期长、成本高、产量少;非保护性异源抗体的存在大大增加了速发型超敏反应和血清病发病几率[2-4]。目前,国内外科学家已开始研究通过改进免疫制备方法,或者筛选单组分毒素、模拟表位以替代目前使用的全蛇毒免疫动物获得抗蛇毒血清的方法,以减少不良反应发生率[5-8]。我们认为针对蛇毒主要毒素的亚单位疫苗或具有中和保护性作用的抗原模拟表位是更能满足临床使用的要求,同时最大限度减少不良反应。本实验将通过基因工程技术原核表达尖吻蝮蛇出血性P-Ⅲb型金属蛋白酶AaHⅣ催化结构域(catalytic domain,CD)和非催化结构域(non-catalytic domain,NCD),并比较其不同的免疫保护性,为下一步分析、筛选具有中和保护性作用的抗原表位奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

AaHⅣ催化结构域和非催化结构域cDNA序列由上海捷瑞生物工程有限公司合成,并分别链接在pET28a(+)载体上。表达菌株BL21(DE3)为第三军医大学药学系临床微生物与免疫学教研室保存。AKTA explorer-100蛋白纯化系统及Ni^{2+}-NTA Beads、desalting column均为美国GE公司产品。IPTG购自上海生工公司。ELISA试剂为北京中杉金桥生物技术有限公司产品。AaHⅣ为第三军医大学药学系临床微生物与免疫学教研室前期纯化。48只昆明小鼠[4周龄,体质量(20±2)g,雌雄各半]购自第三军医大学实验动物中心。其他试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 AaHⅣ CD和NCD cDNA序列合成 从GenBank上分别获得AaHⅣ(ACCESSION:Q9W6M5)CD和NCD氨基酸序列,使用Primer Premier5.0将其催化结构域和非催化结构域分别翻译为cDNA序列,进行在线密码子优化(www.jcat.de/Result.jsp),优化后的cDNA序列加上分别在3′,5′端加上*Nde* Ⅰ和*Xho* Ⅰ酶切位点后,提交上海捷瑞生物工程有限公司合成,并重组在pET28a(+)质粒上,表达产物将带有His标签。

1.2.2 AaHⅣ CD和NCD蛋白片段重组表达 分别将重组质粒pET28a(+)-CD、pET28a(+)-NCD经$CaCl_2$法转化BL21(DE3)。经Kana抗性平板筛选后,挑选适中阳性菌落接种在LB培养液中培养。待菌液$D(600)\approx0.8$时,加入IPTG(终浓度0.5 mmol/L)37 ℃诱导4 h。分别取菌液鉴定表达形式。

1.2.3 CD和NCD蛋白片段纯化 pET28a(+)-CD/BL21(DE3)菌液经4 ℃,12 000×*g*,10 min离心收集沉淀。1.5% Triton X-100重悬后经超声裂解包涵体,4 ℃,12 000×*g*,10 min,离心收集沉淀(上述步骤重复3次)。取样染色后于显微镜下观察破菌效果,未破细菌<2个/油镜视野为裂菌完全。8 mol/L尿素(PBS)溶解蛋白沉淀,4 ℃,12 000×*g*,10 min去除杂质。Ni^{2+}-NTA Beads以ddH_2O洗涤后经8 mol/L尿素(PBS)平衡,然后上样8 mol/L尿素(PBS)蛋白液,密封后固定于垂直转子上4 ℃振荡过夜结合。次日以滤管分离Ni^{2+}-NTA Beads并用8 mol/L尿素(PBS)洗去杂蛋白,然后用25、50、100、200、500 mmol/L不同浓度的咪唑/尿素(PBS)梯度洗脱目的蛋白。将带有质粒pET28a(+)-NCD诱导表达后的菌体以PBS悬浮,4 ℃预冷后超声破菌。取样染色后于显微镜下观察破菌效果,未破细菌<2个/油镜视野为裂菌完全。经12 000×*g*,30 min高速离心后,分离留取上清,弃沉淀。Ni^{2+}-NTA Beads以ddH_2O洗涤后经PBS平衡,然后与超声破菌上清液混合,密封后固定于垂直转子上4 ℃振荡过夜结合。次日以滤管分离Ni^{2+}-NTA Beads并用PBS洗去杂蛋白,然后用含有25、50、100、200、500 mmol/L的咪唑(PBS)液洗脱目的蛋白。

1.2.4 CD和NCD蛋白片段洗脱液脱盐 上述步骤鉴定的含有CD的500 mmol/L咪唑/尿素(PBS)洗脱液和含有NCD的500 mmol/L咪唑(PBS)洗脱液经截留值为相对分子质量10 000的Millipore超滤离心管进行浓缩。将desalting column连接到AKTA explorer-100层析系统,对浓缩后的目的蛋白液进行脱盐处理。脱盐后的目的蛋白液经BCA法测定浓度。

1.2.5 小鼠免疫 将4周龄昆明小鼠[体质量(20±2)g,雌雄各半]24只,随机分为4组:①AaHⅣ免疫组;②CD免疫组;③NCD免疫组;④PBS组($n=6$,雌雄各半)。前3组免疫原剂量:50 μg/只;抗原液体积:100 μL/只。PBS组采用100 μL/只皮下注射作阴性对照。采用第0、2、4周腋下、腹股沟皮下免疫,首次免疫采用完全弗氏佐剂,第2、3次免疫采用不完全弗氏佐剂。5周后断尾采血经间接ELISA法测定抗体效价。

1.2.6 出血中和实验 第3次免疫后1周小鼠摘眼球取血,分离抗血清。各组分别取抗血清(30 μL)与新鲜纯化的AaHⅣ(6 μg)混合,用PBS稀释至600 μL,37 ℃体外孵育1 h。4周龄昆明小鼠24只,随机分为CD免疫组、NCD免疫组、PBS免疫组和AaHⅣ免疫组[$n=6$,体质量(20±2)g,雌雄各半]。体外孵育好的抗血清与AaHⅣ孵育液行小鼠背部皮肤皮内注射100 μL/只,24 h后将小鼠断颈处死,取背部皮肤观察并测量出血面积。

1.3 统计学处理

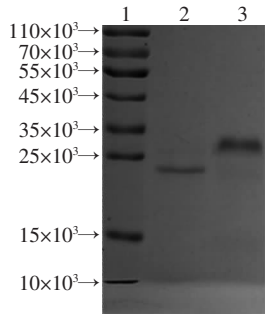
计量资料采用$\bar{x}\pm s$表示。实验结果采用SPSS 13.0统计软件进行数据处理,计量资料采用单因素方差分析,组间采用LSD法多重分析。

2 结果

2.1 12% SDS-PAGE电泳结果

诱导前菌液、诱导后菌液及上清、沉淀经12% SDS-PAGE电泳鉴定,CD片段为包涵体形式;NCD片段为可溶表达。12% SDS-PAGE电泳显示经镍柱亲和层析和脱盐后的目的蛋白液在相对分子质量25×10^3附近存在明显条带,分别为CD和

NCD 蛋白片段(图 1)。BCA 法测定浓度分别为 0.28 mg/mL 和1.39 mg/mL。



1:蛋白分子量标准;2:纯化后 CD 片段;3:纯化后 NCD 片段

图 1 纯化后目的蛋白 12%SDS-PAGE 电泳结果

2.2 间接 ELISA 测定抗体效价

间接 ELISA 法测定抗体效价,以公式计算:$[D(490)_{样本} - D(490)_{空白对照}]/[D(490)_{阴性对照} - D(490)_{空白对照}] > 2.1$ 为阳性。结果显示,经过3 次免疫后,CD 免疫组、NCD 免疫组和 AaHⅣ免疫组均能刺激小鼠产生抗体,其中 CD 免疫组抗体平均效价为 1∶128 000,AaHⅣ免疫组抗体平均效价为 1∶256 000,NCD 免疫组抗体效价为 1∶16 000,AaHⅣ催化结构域较非催化结构域免疫原性更好。

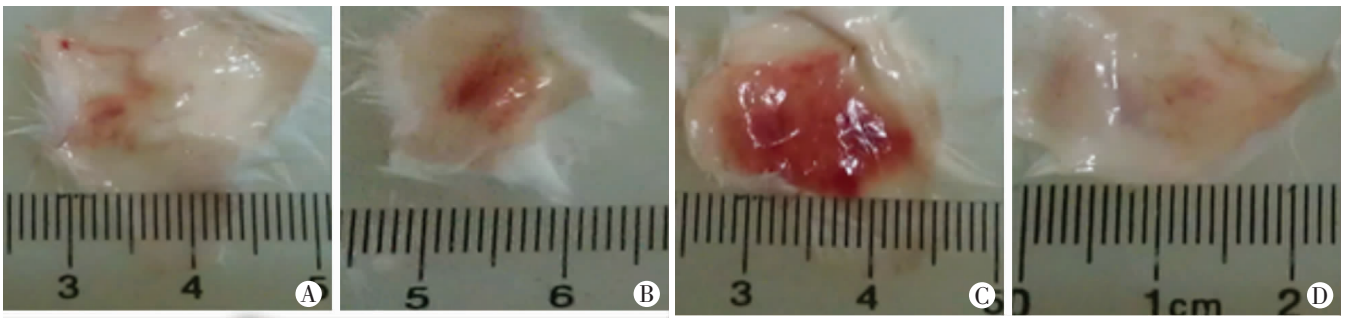
2.3 出血中和实验

皮内注射抗血清与 AaHⅣ孵育液的实验小鼠 24 h 后断颈处死,取皮观察并测量出血面积分别为:CD 免疫组(5.67 ± 6.74)mm^2;NCD 免疫组(16.50 ± 11.04)mm^2;AaHⅣ免疫组(2.83 ± 4.92)mm^2;PBS 免疫组(52.50 ± 16.94)mm^2(图 2)。采用单因素方差分析进行小鼠皮肤出血面积统计分析显示:催化结构域免疫组和非催化结构域免疫组均较 PBS 免疫组显著减少出血面积($P < 0.05$);AaHⅣ免疫组与催化结构域免疫组之间无统计学差异($P > 0.05$),而与非催化结构域免疫组之间存在统计学差异($P < 0.05$)。

3 讨论

1881 年,人们发现 bothropic 类毒蛇毒液具有水解蛋白质的作用,提示该种毒蛇毒液中可能有蛋白酶的存在。1955 年,科学家通过对产自巴西和北美洲的不同毒蛇毒液的分析,证实了蛇毒中含有天然的蛋白水解酶。20 世纪 60 年代,日本科学家发现从蝰蛇毒液中分离出来的一些蛋白酶的活性能够被 EDTA 所抑制,最终明确了该种蛋白酶为金属蛋白酶。目前,SVMPs 被认为是蝰蛇毒液中主要的具有出血活性的毒性成分。Fox[9]等根据其相对分子质量及结构域的不同,将其分为三型:P-Ⅰ型,仅含有 Zn^{2+} 金属蛋白酶结构域;P-Ⅱ型,含有金属蛋白酶结构域和去整合素结构域;P-Ⅲ型,含有金属蛋白酶结构域、类去整合素结构域、富含半胱氨酸结构域。同一类型 SVMPs 根据其经过翻译、加工后在毒液中的不同存在形式,再分为不同亚型。在这个分类系统中,由于尚未证实原有的 P-Ⅳ 型 SVMPs mRNA 分子的存在,故将其归入 P-Ⅲd 型 SVMPs 中[9]。SVMPs 具有的金属蛋白酶结构域具有蛋白水解酶活性,可以水解纤维蛋白原、胶原蛋白等底物,又被称为催化结构域[10];类去整合素结构域和富含半胱氨酸结构域由于无酶活性,也被称为非催化结构域[11]。

尖吻蝮蛇出血性 P-Ⅲb 型 SVMP AaHⅣ,具有完整的金属蛋白酶结构域、类去整合素结构域、富含半胱氨酸结构域。与其他种类的 SVMPs 一样,AaHⅣ金属蛋白酶结构域含有一段“HEXXHXXGXXHD”保守序列,能够水解偶氮酪蛋白、纤维蛋白原、vWF、胶原等,起到破坏毛细血管基底膜和细胞外基质的作用[12];而非催化结构域通过 14 个二硫键和 2 个 Ca^{2+} 的作用形成一个“C”形的凹面,将金属蛋白酶结构域包含在其内部,使其自身暴露在分子外部,更有利于与底物结合,从而为催化结构域发挥作用提供帮助[13]。尽管人们已经对 SVMPs 各个结构域的结构与功能有了一定的了解,并且通过 X 线衍射及 MRI 等技术解析出了部



A:CD 免疫组;B:NCD 免疫组;C:PBS 免疫组;D:AaHⅣ免疫组

图 2 出血中和实验小鼠皮肤出血情况大体观察

分SVMPs的三维结构,但由于其氨基酸序列及空间结构在不同种属、不同毒性毒蛇之间的高度保守性,目前仍不能从蛋白质一级结构或高级结构上分析出不同SVMPs出血性强弱的原因,给中和性抗原表位的筛选带来了巨大的障碍。SVMPs催化结构域对微血管基底膜和细胞外基质等底物的水解作用是其导致出血的基础[14]。本实验中,催化结构域组在减少昆明小鼠皮肤出血面积上较非催化结构域组效果更明显($P<0.05$),而且与阳性对照组之间无统计学差异($P>0.05$),再次证明了催化结构域在致出血活性中的地位;而非催化结构域通过抑制血小板聚集、以及增强与底物的结合等作用,导致凝血功能障碍,强化了催化结构域的作用[15-16]。从上述统计数据分析看,催化结构域组和非催化结构域组均比阴性对照组显著减少AaHⅣ导致的出血面积($P<0.05$),也提示催化结构域和非催化结构域两部分均包含了对AaHⅣ完整分子具有中和保护作用的抗原表位。

综上所述,本实验采用基因工程技术重组表达的尖吻蝮蛇出血性P-Ⅲb型金属蛋白酶AaHⅣ催化结构域和非催化结构域能够激发昆明小鼠产生保护性抗体,并且其催化结构域片段具有更好的小鼠免疫原性,免疫后产生的抗体较非催化结构域免疫产生的抗体在中和完整AaHⅣ分子出血活性方面更为有效,为进一步研究筛选AaHⅣ中和保护性抗原位点,制备高效低毒的抗蛇毒血清奠定了基础。

志谢 本实验得到第三军医大学药学系临床微生物与免疫学教研室毛旭虎教授、罗萍教授、刘开云博士、顾江博士以及董延东等老师倾力支持,在此对他们的无私帮助致以诚挚的谢意

参考文献:

[1] Gutierrez J M, Lomonte B, Leon G, *et al*. Snake venomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming[J]. J Proteomics, 2009, 72(2): 165-182.

[2] Wood A, Schauben J, Thundiyil J, *et al*. Review of Eastern coral snake (Micrurus fulvius fulvius) exposures managed by the Florida Poison Information Center Network: 1998-2010 [J]. Clin Toxicol (Phila), 2013, 51(8): 783-788.

[3] Nordt S P, Clark R F, Lee A, *et al*. Examination of adverse events following black widow antivenom use in California [J]. Clin Toxicol (Phila), 2012, 50(1): 70-73.

[4] Estrada R, Herrera M, Segura A, *et al*. Intravenous administration of equine-derived whole IgG antivenom does not induce early adverse reactions in non-envenomed horses and cows[J]. Biologicals, 2010, 38(6): 664-669.

[5] Liu S, Dong W, Kong T. Preparation and characterization of immunoglobulin yolk against the venom of Naja naja atra [J]. Indian J Exp Biol, 2010, 48(8): 778-785.

[6] Segura A, Herrera M, Villalta M, *et al*. Assessment of snake antivenom purity by comparing physicochemical and immunochemical methods [J]. Biologicals, 2013, 41(2): 93-97.

[7] Azofeifa-Cordero G, Arce-Estrada V, Flores-Diaz M, *et al*. Immunization with cDNA of a novel P-III type metalloproteinase from the rattlesnake Crotalus durissus durissus elicits antibodies which neutralize 69% of the hemorrhage induced by the whole venom[J]. Toxicon, 2008, 52(2): 302-308.

[8] Machado-de-Avila R A, Stransky S, Velloso M, *et al*. Mimotopes of mutalysin-II from Lachesis muta snake venom induce hemorrhage inhibitory antibodies upon vaccination of rabbits[J]. Peptides, 2011, 32(8): 1640-1646.

[9] Fox J W, Serrano S M. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity[J]. FEBS J, 2008, 275(12): 3016-3030.

[10] Wu E L, Wong K Y, Zhang X, *et al*. Determination of the structure form of the fourth ligand of zinc in Acutolysin A using combined quantum mechanical and molecular mechanical simulation[J]. J Phys Chem B, 2009, 113(8): 2477-2485.

[11] Menezes M C, de-Oliveira A K, Melo R L, *et al*. Disintegrin-like/cysteine-rich domains of the reprolysin HF3: Site-directed mutagenesis reveals essential role of specific residues[J]. Biochimie, 2011, 93(2): 345-351.

[12] Fox J W, Serrano S M. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research[J]. J Proteomics, 2009, 72(2): 200-209.

[13] Zhu Z, Gao Y, Zhu Z, *et al*. Structural basis of the autolysis of AaHIV suggests a novel target recognizing model for ADAM/reprolysin family proteins[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 386(1): 159-164.

[14] Escalante T, Rucavado A, Fox J W, *et al*. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases [J]. J Proteomics, 2011, 74(9): 1781-1794.

[15] Shih C H, Chiang T B, Wang W J. Inhibition of integrins αv/α5-dependent functions in melanoma cells by an ECD-disintegrin acurhagin-C[J]. Matrix Biol, 2013, 32(3/4): 152-159.

[16] Tanjoni I, Evangelista K, Della-Casa M S, *et al*. Different regions of the class P-III snake venom metalloproteinase jararhagin are involved in binding to alpha2beta1 integrin and collagen[J]. Toxicon, 2010, 55(6): 1093-1099.

(**收稿**:2013-10-19;**修回**:2013-11-06)

(编辑 栾 嘉)