

# 芋螺毒素 lt1c 的重组表达及镇痛功能\*

王磊<sup>1</sup>, 曾夏芸<sup>2</sup>, 强媛媛<sup>2</sup>, 任政华<sup>2</sup>

(1. 华南农业大学材料与能源学院制药工程系, 广东 广州 510642;  
2. 南海海洋生物技术国家工程研究中心, 广东 广州 510642)

**摘要:** lt1c 是从信号芋螺毒管中发现的一种 A 超家族毒素多肽, 为深入研究其功能, 采用 pTRX 表达系统将 lt1c 与硫氧还蛋白基因进行融合, 转入大肠杆菌进行表达后, 通过超声破碎、亲和层析、酶切和凝胶过滤层析等方法, 最终得到目的蛋白。组织水平的青蛙坐骨神经-腓肠肌活性研究表明, 重组表达的 lt1c 在 6  $\mu\text{mol/L}$  浓度下, 30 min 内完全抑制肌肉的收缩, 且其作用可逆。进一步的功能研究发现, lt1c 能够抑制热板疼痛模型小鼠的舔足反应, 提示 A 超家族芋螺毒素 lt1c 可能具有一定的镇痛活性。该研究为筛选新的多肽镇痛药物奠定了基础。

**关键词:** A-超家族毒素; 芋螺毒素; 重组表达; 镇痛

**中图分类号:** Q78; R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2018) 02-0137-06

## Recombinant expression and functional analysis of conotoxin lt1c

WANG Lei<sup>1</sup>, ZENG Xiayun<sup>2</sup>, QIANG Yuanyuan<sup>2</sup>, REN Zhenghua<sup>2</sup>

(1. Department of Pharmaceutical Engineering, College of Materials and Energy,  
South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;  
2. National Engineering Research Center of South China Sea Marine Biotechnology,  
Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Conotoxin lt1c was identified from the cDNA library of venom gland of *Conus litteratus*. To obtain enough lt1c and investigate the bioactivities, conotoxin lt1c was recombinant and expressed in *Escherichia coli* by fusion with TRX. Conotoxin lt1c was purified by affinity chromatography, enzyme digestion and gel filtration chromatography. The recombinant lt1c showed obvious inhibition activity on the neuromuscular transmission on the frog sciatic/cutaneous pectoris preparation at the concentration of 6  $\mu\text{mol/L}$  in 30 min. lt1c appeared potent and longer-lasting analgesics in the hotplate pain model mice. Additionally, lt1c showed toxicity to mice by intraventricular injection. The successful expression of lt1c with potential analgesic activity provided the possibility for further pharmaceutical research.

**Key words:** A-superfamily; conotoxin; recombinant expression; analgesic

芋螺毒素由于能高度特异的识别和结合不同亚型的离子通道及受体, 因此成为神经药理学研究不可多得的探针和工具, 而且对神经系统疾病具有潜在的药用价值<sup>[1]</sup>。目前已有 1 种芋螺毒素作为镇痛药在临床使用, 至少 10 种芋螺毒素进入了临床研

究<sup>[2]</sup>。A 超家族是研究较多的芋螺毒素超家族之一, 目前发现的 A 超家族芋螺毒素主要包括含有两对二硫键的  $\alpha$  芋螺毒素和含有 3 对二硫键的  $\alpha\text{A}$  和  $\kappa\text{A}$  芋螺毒素<sup>[3]</sup>。 $\alpha$  和  $\alpha\text{A}$  芋螺毒素主要作用于乙酰胆碱受体家族,  $\kappa\text{A}$  芋螺毒素作用于电压门控

\* 收稿日期: 2017-08-30

基金项目: 广东省自然科学基金 (2015A030313191)

作者简介: 王磊 (1972 年生), 女; 研究方向: 海洋生物制药; E-mail: wanglei@scau.edu.cn

通信作者: 任政华 (1954 年生), 女; 研究方向: 生物制药; E-mail: renzhhh@mail.sysu.edu.cn

钾离子通道<sup>[4-6]</sup>。α 芋螺毒素占目前已发现的 A 超家族芋螺毒素的大多数, 具有 CC-C-C 骨架结构, 其二硫键以 1-3, 2-4 的配对方式形成 loop 环框架, 根据 loop 环中的氨基酸数量的不同又可将 α 芋螺毒素分为 α3/5、α4/7 和 α4/3 等多个亚家族<sup>[7]</sup>。αA- 和 κA- 芋螺毒素具有完全不同的二硫键骨架, 结构为 CC-C-C-C-C, 这些结构上的差异也直接导致了他们在生理功能上也有明显的分化和不同。作为 nAChR 受体的竞争性拮抗剂, α 和 αA 芋螺毒素可以选择性作用于 nAChR, 而 kA- 芋螺毒素则主要作为阻断剂作用于电压敏感型钾离子通道。

对 α- 家族芋螺毒素研究最多的是其镇痛功能, 如 α- 家族芋螺毒素家族成员 vc1.1 通过阻断外周初级传入神经元的 nAChRs 而发挥止痛作用<sup>[8-9]</sup>。具有比吗啡和 Ziconotide 药效更强和持续时间更长的镇痛效果, 且无吗啡和 Ziconotide 引起的副反应 (如便秘、呼吸抑制等), 极有望开发成为高效止痛药物。此外 α 芋螺毒素因能选择性阻断 nAChRs 的某种亚型, 除有止痛效果外, 也有望开发成用于治疗帕金森氏病、焦虑症和高血压等病症的药物。中枢神经系统谷氨酸能神经传导失调造成癫痫, α 芋螺毒素 Conantokins 能特异阻断 NM-DA 受体亚型, 可开发成抗惊厥、抗癫痫药物<sup>[10-11]</sup>。

本文在前期的研究中, 从信号芋螺 cDNA 文库中, 发现一条 A 超家族芋螺毒素 lt1c, 其序列为: GMWDECCDDPPCRQNNMEHCPAS, 具有与 α 芋螺毒素相同的 CC-C-C 骨架结构, 推测其可能具有镇痛活性。由于 lt1c 由 23 个氨基酸组成, 属于小肽, 可通过化学固相合成的方法获得多肽, 但前期研究结果表明 (未发表数据), 多肽合成过程中氨基酸的偶联效率很低。因此, 本研究采用了以硫氧还蛋白为融合伴侣的 pTRX 载体, 在大肠杆菌中对该毒素进行了成功的重组表达, 并对其毒性、镇痛活性进行了初步研究, 为进一步的应用开发打下了基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 质粒与菌株

原核融合表达载体质粒 pTRX-Neu5 由彭立胜博士构建, 本实验室保存<sup>[12]</sup>。大肠杆菌 DH5α 购自 Invitrogen 公司, 由本实验室保存。大肠杆菌表达宿主菌 BL21 (DE3) 购自 Stratagene 公司, 由本实验室保存。

### 1.2 试剂与耗材

限制性内切酶 *Kpn* I、*Not* I 及 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; LA Taq 酶购自大连宝生物公司; dNTP 购自上海生工生物工程公司; 10 × PCR Buffer 购自鼎国公司; Gel Extraction Kit 和 Plasmid Miniprep Kit 为 OMEGA BIOTEK 公司产品; PCR Clean-Up Kit 为 Axygen Biosciences 公司产品; DNA ladder 购自 Tiangen 公司; 低相对分子量标准蛋白 (14 400 000 ~ 108 000 000) 购自凯基生物公司; Pro-3C 蛋白酶为本实验室自产; 色谱级 TFA (三氟乙酸) 为 Sigma 公司产品; Tryptone 和 Yeast Extract 为 Oxoid 公司产品; T7 promoter sequencing primer (T7), T7 terminator primer (T7T), lt1c 基因的寡聚核苷酸引物由 invitrogen 公司合成; BCA 蛋白定量试剂盒购自美国 Pierce 公司; Trypton 和 Yeast Extract 为 Oxoid 公司产品; 其它试剂均为国产分析纯试剂。

### 1.3 主要仪器

PCR 仪为美国 MJ Research 公司, 型号 PTC-200; DNA 测序仪为 Applied Biosystems 公司产品, 型号 3730 DNA Analyzer; 电泳系统为 Bio-RAD 公司产品, 型号 Mini Protein III; 超声波细胞粉碎机为宁波新芝科器研究所产品, 型号 JY92-II; Biologic LP 层析系统为 BIO-RAD 公司产品; AKTA explorer 层析系统为 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品; 色谱柱为上海锦华仪器设备厂和 Pharmacia 公司产品; 层析柱料 Ni<sup>2+</sup>-Chelating Sepharose Fast Flow, Sephadex G25 (Fine), Sephadex G50 (Fine) 均为 Pharmacia 公司产品; 激光飞行质谱仪型号为 REFLEX III (Germany Bruker 公司产品)。分光光度计 Biophotometer 为 Effendorf 公司产品; 肌肉张力换能器为成都仪器厂产品, 型号 JZJ01; 电刺激器, 型号 JL-B, 为成都泰盟科技有限公司产品; 热板仪, 型号 RB-200, 为成都泰盟科技有限公司产品。

### 1.4 芋螺毒素基因的制备和表达载体的构建

根据 lt1c 基因编码序列和大肠杆菌密码子的偏好性, 结合 pTRX 两端的 *Kpn* I 和 *Not* I 酶切位点设计合成 4 段 Oligo (Oligo 1: 5' CCTG GAA GTT CTG TTC CAG GGG CCC GGC ATG TGG GAT GAA TGC TGT 3'; Oligo 2: 3' CATGG GAC CTT CAA GAC AAG GTC CCC GGG CCG TAC ACC CTA CTT ACG ACA CTG CTA 5'; Oligo 3: 5' GAC GAT CCG CCG TGT CGC CAA AAT AAT ATG GAG CAT TGT CCG GCA AGT TAA TAAGC 3'; Oligo 4: 3' GGC

GGCACA GCG GTT TTA TTA TAC CTC GTA ACA GGC CGT TCA ATT ATTCGCCGG 5'), 在目的基因的 5' 端加入 *Kpn* I 酶切位点和蛋白酶 Pro-3C 的识别位点, 3' 端加入 *Not* I 酶切位点和两个终止密码子。4 个 oligo 片段分别进行磷酸化, 并分为互补配对的两组进行退火。质粒 pTRX 用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Not* I 进行酶切线性化。用 T4 DNA 连接酶将两组 oligo 片段和线性化的 pTRX 载体连接。连接产物 pTRX-lt1c 转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中, 挑取单克隆培养提取质粒, 经纯化后用 T7 和 T7T 引物进行双向核酸测序, 对重组表达质粒进行鉴定。

### 1.5 重组蛋白 TRX-lt1c 在大肠杆菌中的诱导表达

将测序正确的重组表达质粒 pTRX-lt1c 转化表达宿主菌 BL21 (DE3), 构建工程菌株。挑取工程菌株单菌落接种于 Amp<sup>+</sup> 的 LB 液体培养基中, 37 °C 剧烈振荡培养过夜, 作为种子菌。取种子菌按 1:100 体积比接种于新鲜的 Amp<sup>+</sup> LB 培养基中, 37 °C 剧烈振荡放大培养至 A<sub>600nm</sub> 约为 0.8 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L, 同时加入 *w* = 20% 葡萄糖至终质量分数为 0.2%, 于 20 °C 诱导表达 10 h。4 °C、5 000 r/min 离心 10 min 收菌, 以 300 W 的功率, 冰浴下超声 30 min ~ 2 h, 破碎细菌细胞 (时间长短由菌量决定), 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min 后分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析检测重组蛋白质的表达情况。

### 1.6 重组蛋白 lt1c 的纯化

融合蛋白采用镍亲和和层析柱进行纯化。首先用 5 倍柱床体积的超声缓冲液对镍层析柱进行平衡; 将超声后的离心上清上样, 用超声缓冲液洗柱至紫外吸收值达到基线; 分别用不同浓度咪唑 (20、50、100 和 200 mmol/L) 的 50 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, pH 8.0 缓冲液洗脱, 每个浓度的咪唑都洗至平台期, 分别收集洗脱峰进行 *w* = 15% SDS-PAGE 检测。

纯化后的 TRX-lt1c 用 Pro-3C 酶进行酶切, 酶切条件为 25 °C 下 4 h。酶切产物用 G50 凝胶过滤层析进行纯化, Sephadex G50 Fine 分子筛层析柱规格为 Pharmacia XK50 (5.0 cm × 100 cm), 使用 AKTA explorer 系统进行中压层析, 流速恒定为 2 mL/min。收集紫外吸收峰, SDS-PAGE 电泳检测样品。

纯化的毒素样品进行真空冻干干燥, 冻干粉 -80 °C 保存备用。

### 1.7 重组蛋白 lt1c 的质谱鉴定

纯化的重组 lt1c 冻干样品用  $\varphi$  = 1% 的三氟乙

酸溶解, 取 1  $\mu$ L 进行激光飞行时间质谱分析, 基质为芥子酸 (3, 5 - 二甲基 - 4 - 羟基肉桂酸)。测定时加速电压为 25 kV, 正离子反射检测, 光源为氮激光光源, 波长 337 nm。

### 1.8 动物毒性实验

选取 18 ~ 22 g 的昆明小鼠进行毒性试验, 小鼠的性别不限。称取纯化冻干后的 lt1c 粉末溶于纯水中。对昆明小鼠进行脑室注射, 注射体积为 10  $\mu$ L, 注射剂量分别为 0.2、0.4 和 0.6 mg/kg。每组注射 5 只小鼠, 注射后将小鼠放入透明观察筒中进行观察。并记录小鼠的行为学表现。

### 1.9 组织水平活性测定

根据序列分析推测 lt1c 属于  $\alpha$  家族毒素, 可能作用于乙酰胆碱受体, 所以采用了青蛙坐骨神经 - 腓肠肌标本法来检测 lt1c 是否具有阻断神经肌肉传导的作用<sup>[13]</sup>。

以连续单刺激的方式给予坐骨神经电刺激, 刺激参数为: 延时 100 ms, 波宽 0.5 ms, 频率 0.5 Hz, 强度 5 V, 扫描速度为 4.00 s/div, 记录腓肠肌收缩的张力大小作为毒素作用前的对照。用无菌脱脂棉给药, 每 5 min 给予坐骨神经电刺激、记录腓肠肌收缩曲线, 每次刺激记录 6 ~ 10 次, 至腓肠肌收缩被完全抑制或作用至 60 min。

腓肠肌收缩被完全抑制后, 用新鲜任氏液冲洗腓肠肌标本, 每 5 min 给予坐骨神经刺激、观察腓肠肌收缩的恢复情况。

### 1.10 镇痛活性测定

实验采用体质量 20  $\pm$  2 g 的雌性昆明小鼠。实验前先对小鼠进行筛选, 将小鼠放于事先加热到 55 °C 的热板测痛仪上, 记录小鼠自投入热板至出现舔后足的时间为该鼠的痛阈值, 测定 2 次, 挑选出痛阈值不超过 30 s 的小鼠为合格者进行正式实验。注射体积为 10  $\mu$ L, 注射剂量为 12.5、25、50 和 100  $\mu$ g/kg, 空白对照组给予等体积的生理盐水。于注射给药后 0.5、2、3、5、7 和 24 h 测定, 如痛阈值超过 60 s 则按 60 s 计算 (以免时间过长烫伤小鼠足部)。实验结束后, 数据进行统计学处理<sup>[14]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 pTRX-lt1c 表达载体的构建

4 段 Oligo 磷酸化互补后与线性化的载体 pTRX 相连, 转入 DH5 $\alpha$  中进行扩增; 挑取 11 个单克隆以及自连对照用 T7 promoter sequencing primer 和 T7 terminator primer 引物进行菌落 PCR 检测, 如图 1

所示。其中泳道 2、4-7、10-12 为阳性克隆, 3、9 为自连, 13 为自连对照。

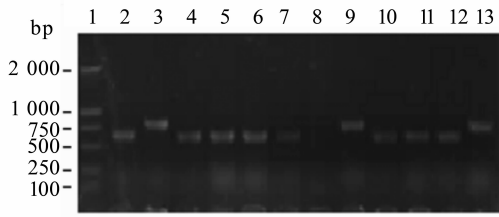


图 1 连接产物菌落 PCR 鉴定

Fig. 1 The clony PCR result of ligation product colonies

1: DL2000 DNA ladder; 2-12: ligation product colonies;  
13: self-ligation colony control

阳性克隆提取质粒后, 对纯化后的 pTRX-lt1c 重组质粒用 T7 promoter sequencing primer 和 T7 terminator primer 引物进行双向测序, 其序列与合成的模板序列结果完全一致, 并且读码框正确 (测序结果略), 表明表达载体构建成功。

## 2.2 重组蛋白在大肠杆菌中的诱导表达

转入表达质粒 pTRX-lt1c 的工程菌诱导表达选用了较低浓度 IPTG, 低温和长时间诱导的策略。当工程菌生长至  $A_{600nm} = 0.8$  时, 添加终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG, 在 20 °C 诱导 10 h, 离心收取菌体; 超声后, 取样总菌、上清和沉淀, 用  $w = 15\%$  SDS-PAGE 检测蛋白的表达量及可溶性, 电泳结果见图 2a。融合蛋白相对分子质量预测约 16 600 左右, 在图 2 可以看到诱导后在相对分子质量附近有

一个明显的条带, 而且超声后重组蛋白都在超声上清中, 可溶性较好。

## 2.3 融合蛋白的纯化

由于重组信号芋螺毒素 TRX-lt1c 融合蛋白在融合伴侣和目的蛋白之间有 6 × His 标签。因此可利用  $Ni^{2+}$  金属离子层析纯化融合蛋白。将处理好的镍亲和层析柱, 用超声缓冲液平衡 5 倍柱床体积。表达 TRX-lt1c 的大肠杆菌 4 °C 离心收菌, 称量, 每 1 g 湿菌中加入 10 mL 超声缓冲液重悬菌体, 超声破菌, 离心超声的样品, 取上清液进行  $Ni^{2+}$  - Chelating Sepharose Fast Flow 亲和层析。在 280 nm 下紫外检测同时监控电导率。样品用平衡缓冲液洗脱至基线后, 依次用不同咪唑浓度的洗脱液进行洗脱, 收集洗脱峰, 进行电泳分析。用  $w = 15\%$  SDS-PAGE 分析 (图 2b) 结果表明, 重组蛋白对  $Ni^{2+}$  - Chelating Sepharose 具有较高的亲和力, 在穿流峰不大于 50 mmol/L 的咪唑洗脱峰里, TRX-lt1c 融合蛋白的含量都极少; 大部分重组 TRX-lt1c 蛋白在 100 mmol/L 的咪唑浓度下就可以洗脱, 在 200 mmol/L 咪唑的峰中仅可以看到少量的融合蛋白。经过咪唑梯度洗过, 可获得纯化的融合蛋白。

## 2.4 融合蛋白的酶切与目的蛋白的纯化

融合蛋白 TRX-lt1c 用 Pro-3C 酶切将伴体蛋白切除后的电泳结果 (图 2c) 表明, 融合蛋白被有效切割, 因此, 相对分子质量变小, 由于切下的目的蛋白 lt1c 相对分子质量过小, 无法在蛋白胶上直接显示, 只能看到硫氧还蛋白 TRX 条带。

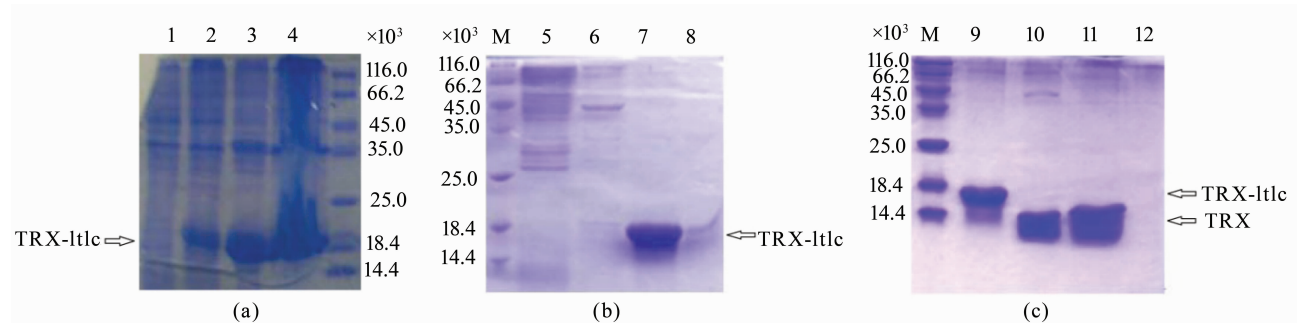


图 2 重组蛋白的表达和纯化的 SDS-PAGE 检测

Fig. 2 SDS-PAGE analyse of expression and purification of recombinant TRX-lt1c

M: Protein molecular standard; 1: Total bacterial protein before IPTG induction; 2: Total bacterial protein after IPTG induction; 3: Total soluble bacterial protein induced by IPTG after ultrasonification; 4: Precipitation of total bacterial protein induced by IPTG after ultrasonification; 5: washed protein from  $Ni^{2+}$  Chelating Sepharose chromatography by 20 mmol/L imidazole; 6: washed protein from  $Ni^{2+}$  Chelating Sepharose chromatography by 50 mmol/L imidazole; 7: washed protein from  $Ni^{2+}$  Chelating Sepharose chromatography by 100 mmol/L imidazole; 8: washed protein from  $Ni^{2+}$  Chelating Sepharose chromatography by 200 mmol/L imidazole; 9: purified fusion protein of TRX-lt1c; 10: sample of the fusion protein TRX-lt1c digested by Protease 3C; 11: the first fraction of Sephadex G50 (TRX); 12: the second fraction of Sephadex G50 (purified recombinant conotoxin lt1c)

相对分子质量为 13 800，两种蛋白的相对分子质量差别较大，因此可采用分子筛效应根据蛋白相对分子质量的大小将蛋白分开，得到纯化的目的蛋白。Sephadex G50 分子筛的分离范围为 1 500 ~ 30 000，因此采用 Sephadex G50 纯化酶切后的目的蛋白。电泳结果（图 2c）显示 G50 分子筛层析的第 1 个峰是 TRX 伴侣，第 2 个峰在电泳图上没有显示，推测为目的蛋白 lt1c，取该峰冻干后进行质谱鉴定。

### 2.5 lt1c 的质谱鉴定

质谱结果如图 3 所示。从质谱鉴定结果（图 3）可知，纯化的 lt1c 二价离子峰  $m/z$  为 1 394.9，通过计算，lt1c 的实际相对分子质量为 2 787.8，与预期的相符，说明 lt1c 重组表达纯化成功。

### 2.6 lt1c 对青蛙坐骨神经 - 腓肠肌神经肌肉传导的影响

本节研究采用了蛙坐骨神经 - 腓肠肌标本法检测中国南海信号芋螺 A 超家族毒素 lt1c 在突触后膜、运动终板上的阻断活性和缓解情况。图 4 的结果表明，lt1c 在 6  $\mu\text{mol/L}$  浓度下，30 min 内完全抑制肌肉的收缩，在 lt1c 完全阻断神经传导后，用新鲜的任氏液反复冲洗腓肠肌标本，能够恢复 60% 左右的活性，这说明 lt1c 对神经的阻断作用是可逆的。

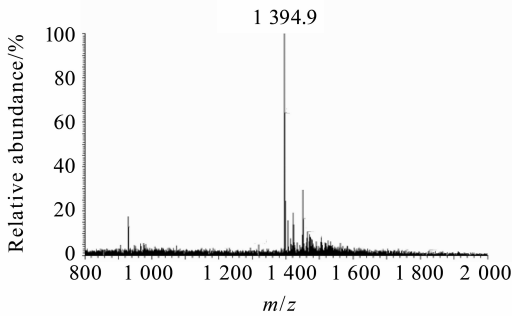


图 3 重组表达纯化的 lt1c 质谱分析  
Fig. 3 MS analysis of purified lt1c

### 2.7 lt1c 的镇痛活性

由热板法实验结果可知，lt1c 能够有效抑制热刺激引起的小鼠舔后足反应，其中以 50 和 100  $\mu\text{g/kg}$  剂量组效果较好，给药 2 和 3 h 的痛阈值与同期空白对照组小鼠的相比，具有显著性差异，初步提示 lt1c 样品具有一定的中枢镇痛作用，有望用于制备镇痛药物。其作用机理可能是通过阻断外周初级传入神经元的 nAChRs 而产生镇痛作用。

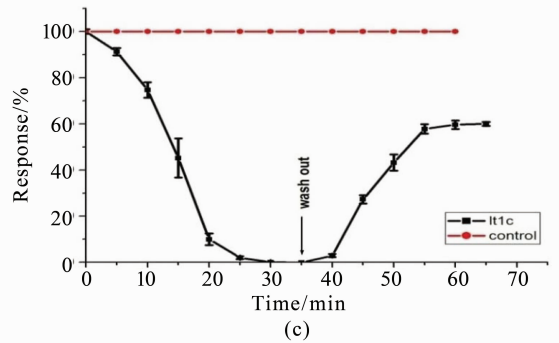
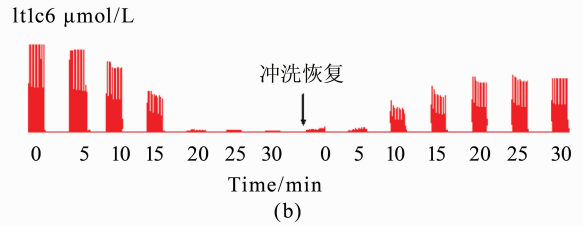
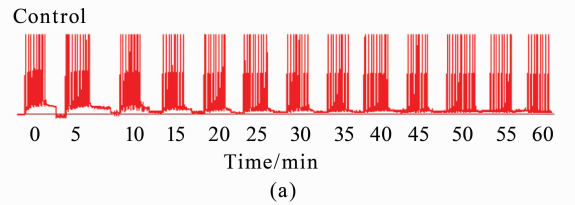


图 4 lt1c 对青蛙坐骨神经 - 腓肠肌神经肌肉传导的影响  
Fig. 4 Effect of lt1c on neuromuscular transmission on the frog sciatic/cutaneous pectoris preparation (a) Control of Ren'solution; (b) Effect of 6  $\mu\text{mol/L}$  lt1c on the preparation and partial reconvert after wash-out from total suppression; (c) Response-Time course of control and lt1c on the the frog sciatic/cutaneous pectoris preparation

### 2.8 lt1c 对小鼠的神经毒性

由表 1 小鼠脑室注射的毒性研究结果可知，注射剂量为 0.2 mg/mL 时，小鼠表现正常，注射剂量为 0.4 mg/mL 时，小鼠出现异常表现，在注射 10 min 左右，小鼠的表现为不停微点头、抓挠，并在 20 min 时出现持续性的蹦高。注射剂量为 0.6 mg/kg 时，注射 10 ~ 15 min 时，小鼠表现为乱窜蹦高。表明在注射剂量为 0.4 mg/mL 以上，lt1c 对小鼠有一定的神经毒性。

表 1 脑室注射 lt1c 对小鼠行为的影响  
Table 1 Effect of lt1c on the behavioral of mice

剂量/( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	表现
0.2	正常
0.4	9 ~ 10 min 出现不停微点头，抓挠状 20 min 左右出现持续的蹦高
0.6	10 ~ 15 min 突然满场乱窜乱蹦状，随后恢复正常

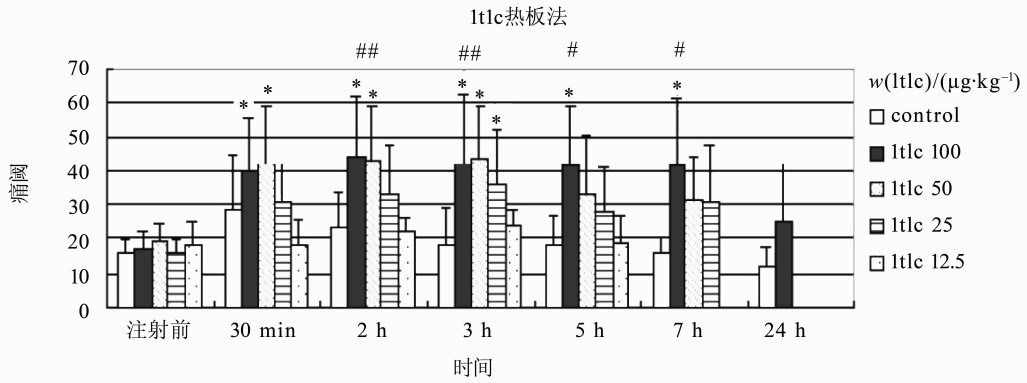


图 5 芋螺毒素 Lt1c 对热板实验小鼠痛阈的影响

Fig. 5 Analgesic assay of Lt1c tested by method of hotplate mice

\* 为与注射前比  $P < 0.01$ , # 为与空白对照组比  $P < 0.01$ ,  $n = 8$

### 3 结论

为深入研究 A 超家族芋螺毒素 Lt1c 的功能,本研究构建了融合表达载体 pTRX-Lt1c,在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中,融合蛋白 TRX-Lt1c 获得了可溶性的表达,并经过镍亲和层析、Pro3C 酶切和 G50 分子筛层析,获得了高纯度的重组芋螺毒素 Lt1c。该毒素在特定浓度下,在蛙的坐骨神经-腓肠肌标本中表现出了时间依赖性的阻断神经传导效应,而且其阻断是可逆的。由小鼠热板镇痛实验结果可知,重组 Lt1c 能够有效抑制热刺激引起的小鼠舔足反应,推测该毒素具有一定的中枢镇痛作用。

#### 参考文献:

- [1] MIR R, KARIM S, KAMAL M A, et al. Conotoxins: structure, therapeutic potential and pharmacological applications [J]. Current Pharmaceutical Design, 2016, 22:582-589.
- [2] ESSACK M, BAJIC V B, ARCHER J A. Conotoxins that confer therapeutic possibilities [J]. Marine Drugs, 2012, 10:1244-1265.
- [3] SANTOS A D, MCINTOSH J M, HILLYARD D R, et al. The A-superfamily of conotoxins: structural and functional divergence [J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279:17596-17606.
- [4] LEBBE E K, PEIGNEUR S, WIJESEKARA I, et al. Conotoxins targeting nicotinic acetylcholine receptors: an overview [J]. Marine Drugs, 2014, 12:2970-3004.
- [5] TEICHERT R W, RIVIER J, DYKERT J, et al. AlphaA-Conotoxin OIVA defines a new alphaA-conotoxin subfamily of nicotinic acetylcholine receptor inhibitors [J]. Toxicon, 2004, 44:207-214.
- [6] TEICHERT R W, JACOBSEN R, TERLAU H, et al.

- Discovery and characterization of the short kappaA-conotoxins: a novel subfamily of excitatory conotoxins [J]. Toxicon, 2007, 49:318-328.
- [7] MUTTENTHALER M, AKONDI K B, ALEWOOD P F. Structure-activity studies on alpha-conotoxins [J]. Current Pharmaceutical Design, 2011, 17:4226-4241.
- [8] NAPIER I A, KLIMIS H, RYCROFT B K, et al. Intrathecal alpha-conotoxins Vc1.1, AuIB and MII acting on distinct nicotinic receptor subtypes reverse signs of neuropathic pain [J]. Neuropharmacology, 2012, 62:2202-2207.
- [9] YU R, KOMPELLA S N, ADAMS D J, et al. Determination of the alpha-conotoxin Vc1.1 binding site on the alpha9alpha10 nicotinic acetylcholine receptor [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2013, 56:3557-3567.
- [10] BERECKI G, MCARTHUR J R, CUNY H, et al. Differential Cav2.1 and Cav2.3 channel inhibition by bafilofen and alpha-conotoxin Vc1.1 via GABAB receptor activation [J]. Journal of General Physiology, 2014, 143:465-479.
- [11] CASTRO J, HARRINGTON A M, GARCIA-CARABALLO S, et al. alpha-Conotoxin Vc1.1 inhibits human dorsal root ganglion neuroexcitability and mouse colonic nociception via GABAB receptors [J]. Gut, 2017, 66:1083-1094.
- [12] WANG L, OU J, PENG L, et al. Functional expression and characterization of four novel neurotoxins from sea anemone Anthopleurasp [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 313:163-170.
- [13] PENG C, TANG S, PI C, et al. Discovery of a novel class of conotoxin from Conus litteratus, Lt14a, with a unique cysteine pattern [J]. Peptides, 2006, 27:2174-2181.
- [14] REN Z, WANG L, QIN M, et al. Pharmacological characterization of conotoxin Lt14a as a potent non-addictive analgesic [J]. Toxicon, 2015, 96:57-67.