

文章编号: 1674-7054(2023)01-0001-07



α -芋螺毒素LvIA第11位氨基酸的新突变体合成及其靶点活性

李浩楠^{1,2}, 杨奕帅², 长孙东亭², 朱晓鹏², 罗素兰²

(1. 上海儿童医学中心 三亚市妇女儿童医院 药学部, 海南 三亚 572000;

2. 海南大学 热带生物资源教育部重点实验室/海口市海洋药物重点实验室/生命科学与药学院, 海口 570228)

摘要: 为了进一步探究第11位氨基酸的性质对LvIA靶点结合活性的影响, 设计了LvIA的2个新型突变体[D11R]LvIA和[D11H]LvIA, 即用2个碱性氨基酸-精氨酸(R)和组氨酸(H)分别替换原来的酸性氨基酸D。先人工合成了这2个新突变体的线性肽, 然后采用2步氧化法进行折叠, 以获得在第1位和第3位半胱氨酸(Cys 1~3)、第2位和第4位半胱氨酸(Cys 2~4)之间定点连接形成二硫键。经高效液相色谱分离纯化和质谱鉴定, 合成了含有Cys(1~3, 2~4)二硫键连接方式的多肽, 其分子质量正确, 纯度在95%以上。利用双电极电压钳电生理学技术对这2种突变体与 $\alpha 3\beta 2$ nAChR的结合活性进行了检测。结果发现, 当该位点的氨基酸性质由酸性转换为碱性后, 对LvIA的活性影响巨大, 直接导致对 $\alpha 3\beta 2$ nAChR的阻断活性丧失。[D11R]LvIA和[D11H]LvIA的活性与野生型LvIA相比分别降低了574.38%和408.62%。由此表明, 第11位氨基酸的酸碱性质对LvIA的活性至关重要。

关键词: α -芋螺毒素 LvIA; 突变体设计与合成; $\alpha 3\beta 2$ 烟碱型乙酰胆碱受体; 靶点结合活性; 电生理学技术

中图分类号: R 969.3 文献标志码: A

引用格式: 李浩楠, 杨奕帅, 长孙东亭, 等. α -芋螺毒素LvIA第11位氨基酸的新突变体合成及其靶点活性[J].

热带生物学报, 2023, 14(1): 1-7. DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2023.01.004

芋螺(*Cone snail*)是一种肉食性海洋软体动物^[1], 其分泌的芋螺毒液包含许多不同化合物的混合物, 包括小分子、肽和酶。其中, 含有很多不同成分的神经营活性毒素肽-芋螺毒素(Conotoxin, CTx)具有广泛的多样性, 这些具有高活性和靶点选择性的神经小肽大多由6~50个氨基酸残基构成, 富含二硫键, 以特定的离子通道和受体为靶标, 作为药理学工具和探针, 具有较好的开发前景^[2-4]。 α -芋螺毒素(α -conotoxin, α -CTx)是目前研究最广泛和深入的CTxs。 α -CTx分子质量较小, 由12~20个氨基酸残基连接构成, 是各种乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptor, nAChR)亚型的选择性拮抗剂^[5-6]。 α -CTx一般含有4个半胱氨酸(Cys), 根据二硫键的不同连接方式, 可组成

3种异构体, 其中, 大部分 α -CTxs的活性形式为球形。另外, 根据 α -CTx半胱氨酸间氨基酸数量的不同将 α -CTx分为: α -3/5、 α -4/4、 α -4/6、 α -4/7等多种亚家族。 α -CTx不仅作为分子探针, 用以鉴别不同亚型的nAChR, 在治疗与nAChR相关疾病时有着至关重要的作用^[7-9], 并且在成瘾、镇痛等神经生理、药理研究方面也扮演重要角色^[10]。

罗素兰研究团队从疣缟芋螺中分离得到了一种 α -4/7型CTx LvIA, 它由15个氨基酸残基组成, 能够作用于nAChRs, 对 $\alpha 3\beta 2$ nAChR具有较好的活性(IC_{50} 为8.7 nmol·L⁻¹), 但是LvIA对 $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$, $\alpha 3\beta 4$ 和 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ 3种nAChRs亚型保持一定的高亲和力^[11-13]。为了提高LvIA的选择专一性, 前期实验室基于LvIA进行了设计和改

收稿日期: 2022-06-02

修回日期: 2022-06-28

基金项目: 三亚市科技计划项目(2021GXyl42); 国家自然科学基金项目(81872794)

第一作者: 李浩楠(1995-), 女, 临床药师. 研究方向: 药学. E-mail: 370217142@qq.com

通信作者: 罗素兰(1969-), 女, 教授, 博士生导师. 研究方向: 海洋药物. E-mail: luosulan2003@163.com

造,获得了对应的共晶结构,同时也利用受体突变技术解析了它与 $\alpha\beta 2$ nAChR 相互作用的分子机制^[14-15]。研究发现,当第 11 位天冬氨酸(Asp, D)突变成丙氨酸(Ala, A)后对 $\alpha\beta 2$ nAChR 的活性保持不变,共晶实验表明,第 11 位氨基酸影响着 LvIA 与 $\alpha\beta 2$ nAChR 的结合作用^[16-19]。第 11 位是否是 LvIA 的关键氨基酸位点,今后能否基于该位点对 LvIA 进行改造,有待深入研究。

本研究基于 LvIA 前期研究发现的氨基酸信息^[20-22],主要是针对第 11 位氨基酸,对 LvIA 进行进一步设计改造,分别用精氨酸(Arg, R)和组氨酸(His, H)对 Asp 进行取代,设计了 2 种新型突变体,考察第 11 位氨基酸电性和侧链基团对 LvIA 活性的影响,旨在为 LvIA 的设计和开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料与仪器

α -CTx LvIA 及其所有突变体线性肽粗品(吉尔生化上海有限公司),色谱级三氟乙酸(Trifluoroacetic acid, TFA)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司),色谱级乙腈(Acetonitrile, ACN)(ThermoFisher Scientific 公司),N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、碘(I_2)、铁氰化钾($K_3[Fe(CN)_6]$)、甲酸等分析纯试剂(广州化学试剂厂),质粒提取试剂盒(Omega),胶原酶(Collagenase)、乙酰胆碱(ACh)、阿托品(Atropine)(Sigma 公司),DNA 纯化试剂盒(TaKaRa 大连有限公司),体外转录试剂盒(Fisher Scientific 公司),胶原蛋白酶 A(美国 Sigma-Aldrich 公司),圆二色谱检测涉及的试剂由华中科技大学分析测试中心提供;Waters 2695 制备型高效液相色谱仪,Waters e2695 分析型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),岛津电喷雾电离质谱(Electrospray ionization-mass spectrometer, ESI-MS)(美国格雷公司),双电极电压钳系统 Axon 900A 和 Digidata 1550B 数模转换器(美国 Molecular Device 公司),ELGA 超纯水系统(英国 ELGA 公司);分光光度计(Smart SpecTM plus)(美国 Bio-RAD 公司),AlphaImager HP 凝胶成像系统(美国 Protein Simple 公司);实验用非洲爪蟾(美国 Nasco 公司)。

1.2 [D11R]LvIA 和 [D11H]LvIA 的合成和氧化折叠

设计 2 种 LvIA 第 11 位突变体序列送至上

海吉尔生化有限公司,使用固相合成法(Fmoc 法)进行合成(纯度为 80%~85%)。然后使用制备型 RP-HPLC 对合成好的线性肽进行纯化,使产物的纯度达到 95% 以上。纯化得到的线性肽采用两步法氧化的方法进行氧化折叠,保证形成 I-III, II-IV 的二硫键连接结构。第 1 步氧化,将纯化后的线性肽冻干粉溶于 B60(60% 乙腈),缓慢地滴加到铁氰化钾反应液($K_3[Fe(CN)_6]$ 10 mmol·L⁻¹, Tris 0.1 mol·L⁻¹, pH7.5)中,室温充分反应 45 min,促使其形成第 1 对二硫键(Cys-2 和 Cys-8),线性肽浓度不高于 50 g·L⁻¹。利用 RP-HPLC 纯化反应后得到单环产物。将第 1 步纯化后的多肽进行第 2 步氧化。在氮气保护的条件下,逐滴加入到碘(I_2)反应液中(7.5 mmol·L⁻¹ I_2 溶液; $V_{水} : V_{TFA} : V_{ACN} = 73 : 3 : 24$),反应时间 8~12 min,促使其连接 Cys-3 和 Cys-16 形成第 2 对二硫键,反应完毕滴加 VC 饱和溶液至溶液颜色从紫黑色变成无色,终止 I_2 氧化反应,至此,得到包含 2 对二硫键的 LvIA 突变体的最终产物。使用 RP-HPLC 对氧化折叠产物进行纯化(溶剂 A 为 0.075% TFA 水溶液,溶剂 B 为 0.05% TFA、90% ACN,梯度洗脱条件:5%~35%),使其纯度大于 95%,纯化得到的氧化折叠产物利用 ESI-MS 鉴定其分子质量,确定 LvIA 及其突变体是否形成正确的二硫键连接方式。冻干保存,用于后续电生理活性实验。

1.3 乙酰胆碱受体模型的建立

从载入了含(rat, r) $\alpha 3$ 、 $\beta 2$ 2 种亚基基因质粒的 DH5 α 感受态细胞中提质粒,将获取的质粒酶切成线性质粒,然后纯化此线性化 DNA 模板,利用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检验纯度,并使用 Nanodrop 测定浓度。使用 T7 RNA polymerase 体外转录试剂盒将 DNA 模板转录,转录后的 RNA 使用纯化试剂盒进行纯化,纯化的产物 cRNA,再使用分光光度计测定浓度,并使用 0.8% 的琼脂糖凝胶进行纯度鉴定。选取 1 只腹部没有斑点的非洲爪蟾,冰冻 1 h 麻醉,使用手术刀将爪蟾的腹部下侧切开,用剪刀将肌肉剪开,取 2 片蛙卵置于 OR-2 溶液中,再用胰蛋白酶酶解成单个蛙卵,至大部分卵母细胞表面无膜,挑选其中个体均匀,无血丝,黑白分明的爪蟾卵母细胞。按照 1:1 的比例混合成所需的亚型,保证每个细胞的注射量为 50.6 nL,注射后的蛙卵置于含抗生素的 ND96 培养液中(96 mmol·L⁻¹

NaCl, 2 mmol·L⁻¹ KCl, 1.8 mmol·L⁻¹ CaCl₂, 1 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 5 mmol·L⁻¹ HEPES, pH7.1~7.7; 抗生素: 青霉素、10 mg·L⁻¹ 链霉素和 100 mg·L⁻¹ 庆大霉素), 17 °C 培养 2~3 d, 表达 $\alpha3\beta2$ 受体亚型。

1.4 LvIA 突变体活性的检测 将表达了特定受体的卵母细胞放置于细胞槽内, 将双电极电压钳装好 holder, 再把灌注约 1/2 3 mol·L⁻¹ KCl 溶液的电极针安装到 holder 上, 将电极针浸入液面, 调零, 使其钳制电压为 70 V, 基准电流低于 100 nA, 将电压膜片钳打开到 ON 的模式, 钳住细胞, 调节目程序, 每个 Sweep(1 min) 的第 2 秒的时候灌注系统给予蛙卵细胞 100 μ mol·L⁻¹ 浓度的 ACh 刺激, 其余时刻持续使用 ND96 溶液灌注。使用双电极电压钳系统检测和记录蛙卵细胞的电流, 待电流大小稳定以后, 逐次加入经过梯度稀释的待测定活性的 LvIA 突变体, 孵育时间为 5 min, 再一次开启程序, 比较蛙卵细胞加药前后 2 次产生电流的大小差异, 计算反应率(Response)。通过非线性拟

合方程: $\text{Response} = 100 / [1 + ([\text{toxin}] / IC_{50})^{nH}] \times 100\%$ 进行拟合分析, 获取药物作用的剂量反应曲线 (IC_{50} 值), 其中, nH 代表 Hill 系数。

2 结果与分析

2.1 LvIA 突变体合成 纯化线性肽, 使其纯度高于 95%, 用于后续的氧化折叠反应, 连接 2 对二硫键, 将所得产物通过 HPLC 和 MS 鉴定, 具体结果见图 1-A、B。[D11H]LvIA 在乙腈浓度 23% 时洗脱, 洗脱时间为 14.8 min; 而 [D11R]LvIA 在乙腈浓度为 25% 时洗脱, 洗脱时间是 14.9 min。通过质谱确定了 [D11H]LvIA 和 [D11R]LvIA 的相对分子质量, 分别为 1 702.95 和 1 721.99 Du, 与理论值一致, 且均比其线性肽的相对分子量少了 4 Du, 说明成功连接了 2 对二硫键并且末端酰胺化, 见图 1-C、图 1-D。

2.2 乙酰胆碱受体模型建立 提取包含鼠源 $\alpha3$ 、 $\beta2$ 这 2 种亚基的质粒, 使用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳进行纯度检测。从图 2-A 可知, 质粒条带

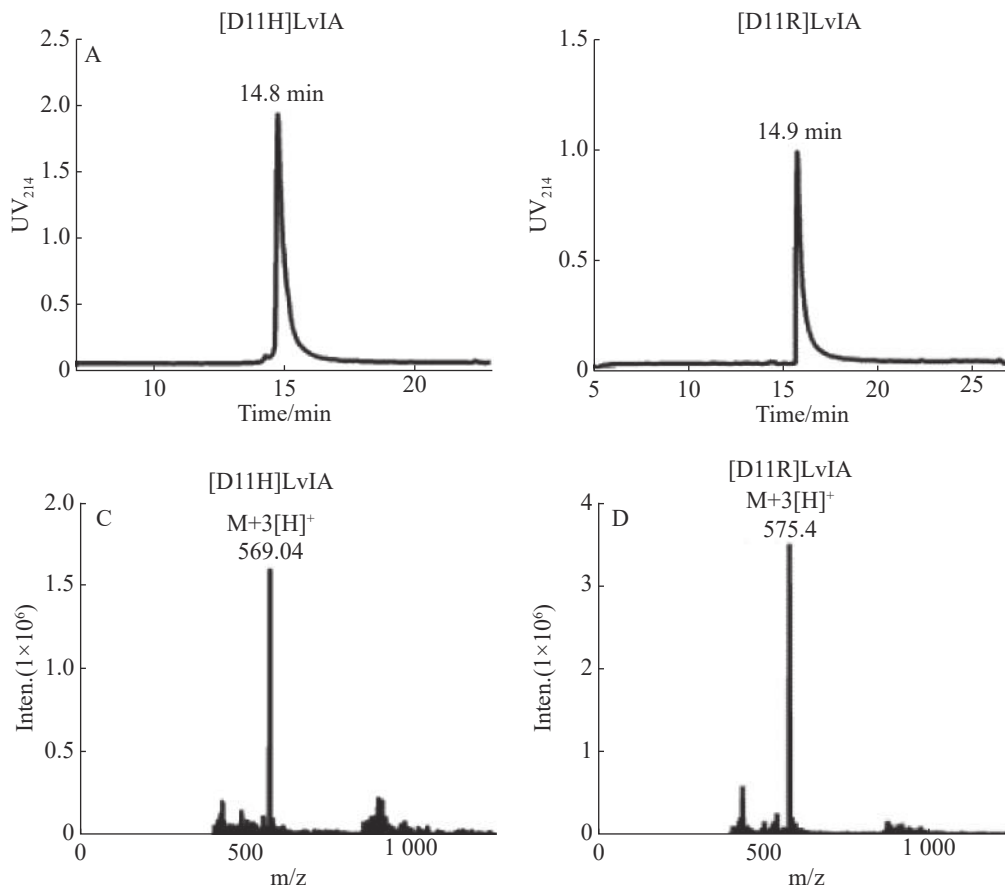


图 1 LvIA 突变体的 HPLC 和 MS 结果

A: [D11R]LvIA 的 HPLC; B: [D11H]LvIA 的 HPLC; C: [D11R]LvIA 的分子质量; D: [D11H]LvIA 的分子质量。

清晰,未发生拖尾情况,超螺旋结构大小在 2 500 bp 左右,符合理论值大小。从图 2-B 可知,条带清晰可见,无弥散现象,超螺旋结构的大小在 5 000 ~ 7 500 bp 范围内。使用紫外分光光度计测定线性质粒的质量浓度,质量浓度皆大于 $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,可以保证后续试验的浓度要求。制备 $\alpha 3$ 、 $\beta 2$ 这 2 种亚基的 cRNA,所得 RNA 的凝胶电泳结果如图 2-C,

图中有 1 条明显的亮带,大小在 750 ~ 1 000 bp 之间,符合理论值, $\alpha 3$ 亚基的浓度为 $0.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\beta 2$ 亚基的浓度为 $0.49 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。将 2 种亚基按照 1 : 1 的比例混合,显微注射到酶解好的爪蟾卵母细胞中(图 2-D),表达 2 ~ 3 d,使用激动剂 ACh 刺激,可以在细胞膜上检测到内向电流,电流大小在 200 ~ 2 000 nA 范围内,如图 2-E。

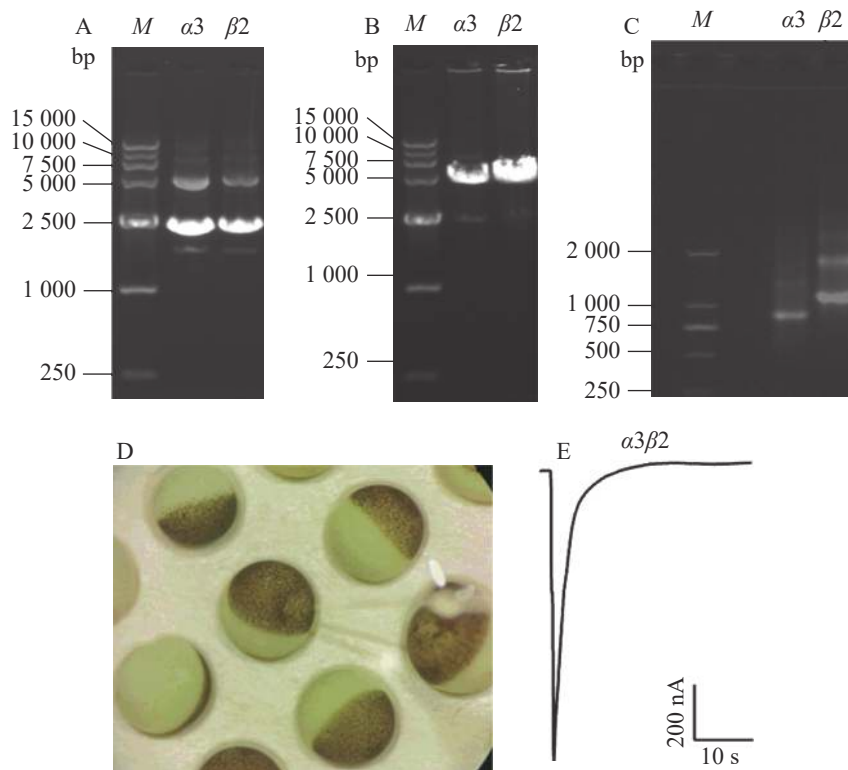


图 2 $\alpha 3\beta 2$ nAChR 模型的建立

A. $\alpha 3$ 和 $\beta 2$ 包含 2 种亚基的质粒琼脂糖凝胶电泳图; B. $\alpha 3$ 和 $\beta 2$ 包含 2 种亚基的质粒酶切后琼脂糖凝胶电泳图; C. $\alpha 3$ 和 $\beta 2$ 2 种亚基的 cRNA 琼脂糖凝胶电泳图; D.非洲爪蟾卵母细胞; E.ACh 激动下 $\alpha 3\beta 2$ nAChR 电流轨迹图。

2.3 LvIA 突变体活性检测 分别将 LvIA 和 2 种 11 位的 LvIA 突变体在表达 $\alpha 3\beta 2$ nAChR 的非洲爪蟾卵母细胞上进行电生理活性检测。在终浓度为 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的孵育条件下, LvIA、[D11R]LvIA

和 [D11H]LvIA 对 $\alpha 3\beta 2$ nAChR 的阻断率分别为 $(95.8\pm 2.8)\%$ ($n=6$)、 $(9.8\pm 2.5)\%$ ($n=7$) 和 $(12.4\pm 3.1)\%$ ($n=5$) (图 3), 与野生型 LvIA 相比, 2 种 11 位突变体对 $\alpha 3\beta 2$ nAChR 活性几乎完全丧失。

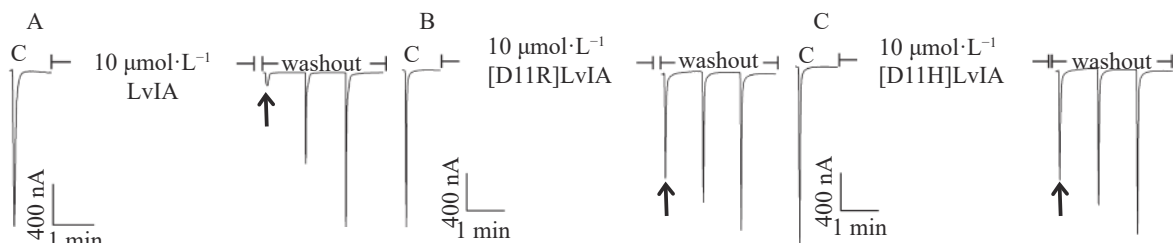


图 3 LvIA 及突变体对于 $\alpha 3\beta 2$ nAChR 的电流轨迹图

为了进一步确定 2 种 LvIA 的 11 位突变体对于 $\alpha 3\beta 2$ nAChR 的阻断活性,笔者做了剂量反应曲

线(图 4),分别测定了 [D11R]LvIA 和 [D11H]LvIA 对 $\alpha 3\beta 2$ nAChR 的 IC_{50} 值, 2 种突变体对于 $\alpha 3\beta 2$

nAChR 的 IC_{50} 值分别为 $8\ 976\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $6\ 390\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (表 1), 活性与比本体的活性相比, 分别降低了 574.38% 和 408.62%。证明当第 11 位的 Asp 变化后, LvIA 的活性大大降低。

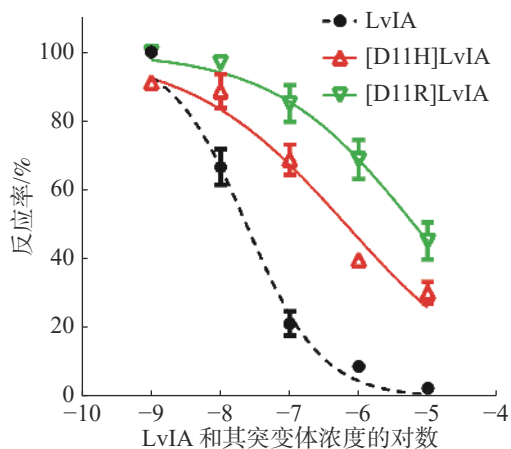


图 4 LvIA 及其突变体对于 $\alpha 3\beta 2$ nAChR 的浓度反应曲线

表 1 LvIA 及 11 位突变体在 $\alpha 3\beta 2$ nAChR 上的 IC_{50}

多肽	$\alpha 3\beta 2$ nAChR		参考文献
	IC_{50} / ($\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) (95% C.I.)	Hill Slope (95% C.I.)	
LvIA	15.6 (12.8 ~ 19.1)	0.71 (0.59 ~ 0.85)	[23]
[D11A]LvIA	12 (9.7 ~ 14.8)	0.84 (0.59 ~ 0.96)	[23]
[D11R]LvIA	8 976 (414 ~ 1050)	0.47 (0.34 ~ 0.78)	本研究
[D11H]LvIA	6 390 (2 961 ~ 13 820)	0.60 (0.48 ~ 0.79)	本研究

注: 置信区间 95%。

3 讨论

$\alpha 3\beta 2$ nAChR 是一种十分重要的受体, 与疼痛、成瘾等生理学作用密切相关。LvIA 是一种十分重要的 α -CTx, 作用于 $\alpha 3\beta 2$ nAChR, 是从疣缟芋螺中发现并且克隆得到的, 对 LvIA 构效关系的研究将有益于获得靶向 $\alpha 3\beta 2$ nAChR 的相关分子探针, 有助于对与 $\alpha 3\beta 2$ nAChR 相关的药理学研究。目前, 发现能够作用于 $\alpha 3\beta 2$ nAChR 的 α -CTx 的有很多, 其中, GIC、MII、OmIA 和 PeIA 等具有较强的靶向作用, 针对这些芋螺毒素的突变改造对于本实验具有借鉴作用^[24-23]。如: 在对 α -CTx MII 的研究中发现, MII 第 11 位的谷氨酸(Glu)与 $\alpha 3\beta 2$ 亚基上带正电荷的残基如: (+) K153 和 (-) K163 形成相互作用, 促进 MII 与 $\alpha 3\beta 2$ nAChR 的结合,

11 位对保证 MII 的活性至关重要^[25]。利用共结晶技术对 α -CTx GIC 的研究发现其第 7 位的 Ala、11 位的 Asn 和 12 位的 Asn 对于 GIC 与受体的结合具有十分重要的作用, 特别是 11 位的 Asn 可以通过形成氢键与 Ac-AChBP 相互作用, 如果改变 11 位的氨基酸, 会影响 GIC 与受体的结合, 11 位氨基酸对于 α -4/7 型 CTxs 与受体的结合起到至关重要的作用^[26]; 在 PeIA 的相关研究中, 也发现 11 位氨基酸分别突变为 Arg 和 Lys 之后, 对 $\alpha 3\beta 2$ nAChRs 的 IC_{50} 分别变为 $30.9\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $45.4\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 基本丧失了活性^[27], 上述结果都证明了 11 位氨基酸对于 α -4/7 型 CTx 活性影响显著。

根据前期研究, 发现 $\beta 2$ 亚基上的 3 个位点: T59K、V111I、F119Q 对 α -CTx LvIA 的敏感性有显著影响, 受体突变加电生理结果表明受体上 59、111 和 119 的 3 个位置, 是与 LvIA 结合的关键位点。罗素兰研究团队对 LvIA 前期研究中, 获得了 LvIA 与 Ac-AChBP 的共晶结构。借助共晶结构和分子动力学模拟发现 $\alpha 3$ 亚基中的 Lys-155 可以与 LvIA 中带负电荷的 Asp-11 形成盐桥, 增加相互作用, 说明第 11 位的 Asp 对于 LvIA 与 $\alpha 3\beta 2$ nAChRs 的相互作用影响较大, 但是将第 11 位突变成 Ala 之后活性保持不变, 所以本研究希望在前期基础上进一步深入探究第 11 位如何影响 LvIA 对于 $\alpha 3\beta 2$ nAChRs 的活性, 针对 11 位所设计的两个突变体 [D11R]LvIA 和 [D11H]LvIA, 当第 11 位氨基酸突变成碱性氨基酸 Arg 和 His 之后, 2 个突变体的活性都极大的降低。结合前期共晶结构和分子动力学模拟分析, 当 11 位突变为碱性氨基酸后, 与 $\alpha 3$ 亚基中的 Lys-155 都为碱性氨基酸, 同性相斥, 结合力减弱, 造成了 LvIA 活性的降低。该研究探究了 11 位的重要作用, 为今后基于 LvIA 的分子设计和改造提供了基础。

参考文献:

- [1] BRUNZELL D H, BOSCHEN K E, HENDRICK E S, et al. Alpha-conotoxin MII-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in the nucleus accumbens shell regulate progressive ratio responding maintained by nicotine [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2010, 35(3): 665 - 673.
- [2] PRASHANTH J R., HASABALLAH N, VETTER I. Pharmacological screening technologies for venom peptide discovery [J]. *Neuropharmacology*, 2017, 127: 4 - 19.

- [3] ALBUQUERQUE E X, PEREIRA E, ALKONDON M, et al. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function [J]. *Physiological Reviews*, 2009, 89(1): 73 – 120.
- [4] SALMINEN O, DRAPEAU J A, MCINTOSH J M, et al. Pharmacology of α -conotoxin MII-sensitive subtypes of nicotinic acetylcholine receptors isolated by breeding of null mutant mice [J]. *Molecular Pharmacology*, 2007, 71(6): 1563 – 1571.
- [5] LUO S L, ZHU X P, WU Y, et al. Conotoxins and drug discovery with special reference to Hainan species [J]. *Toxins and Drug Discovery*, 2017(1): 149 – 187.
- [6] ZHANGSUN D T, ZHU X, WU Y, et al. Key residues in the nicotinic acetylcholine receptor $\beta 2$ subunit contribute to α -Conotoxin LvIA binding [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(15): 9855 – 9862.
- [7] LUO S L, ZHANGSUN D T, SCHROEDER C I, et al. A novel $\alpha 4/7$ - conotoxin LvIA from *Conus lividus* that selectively blocks $\alpha 3\beta 2$ vs. $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ nicotinic acetylcholine receptors [J]. *The FASEB Journal*, 2014, 28(4): 1842 – 1853.
- [8] LIN B, BING H, ZHANGSUN D T, et al. Efficient expression of acetylcholine-binding protein from *Aplysia californica* in Bac-to-Bac system [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2014, 19(10): 1183 – 1193(11).
- [9] BORDIA T, MCGREGOR M, MCINTOSH J M, et al. Evidence for a role for $\alpha 6^*$ nAChR in l-dopa-induced dyskinesias using parkinsonian $\alpha 6^*$ nAChR gain-of-function mice [J]. *Neuroscience*, 2015, 295: 187 – 197.
- [10] AKONDI K B, MUTTENTHALER M, DUTERTRE S, et al. Discovery, synthesis, and structure–activity relationships of conotoxins [J]. *Chemical Reviews*, 2014, 114(11): 5815 – 5847.
- [11] CHANGEUX J P. The Nicotinic acetylcholine receptor: The founding father of the pentameric ligand-gated ion channel superfamily [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(48): 40207 – 40215.
- [12] JENSEN A A, FROELUND B, LILJEFORS T, et al. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: Structural revelations, target identifications, and therapeutic inspirations [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2005, 48(15): 4705 – 4745.
- [13] LIU C, WU P X, ZHU H, et al. Rationally designed α -Conotoxin analogues maintained analgesia activity and weakened side effects [J]. *Molecules*, 2019, 24(2): 337.
- [14] MCINTOSH J M, DOWELL C, WATKINS M, et al. Alpha-conotoxin GIC from *Conus geographus*, a novel peptide antagonist of nicotinic acetylcholine receptors [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(37): 33610 – 33615.
- [15] CUNY H, YU R, TAE H S, et al. α -Conotoxins active at $\alpha 3$ -containing nicotinic acetylcholine receptors and their molecular determinants for selective inhibition [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2018, 175(11): 1855 – 1868.
- [16] KALAMIDA D, POULAS K, AVRAMOPOULOU V, et al. Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors structure, function and pathogenicity [J]. *FEBS Journal*, 2007, 273: 3799 – 3845.
- [17] DONG X, HUANG W, BIAN Y, et al. Remediation and mechanisms of cadmium biosorption by a cadmium-binding protein from *Lentilula edodes* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(41): 11373 – 11379.
- [18] DRENAN R M, MACKEY E, GRADY S R, et al. $\alpha 6^*$ nAChR expression and function in brain areas influencing DA transmission probed with $\alpha 6$ -GFP transgenic mice [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2011, 82(8): 1035 – 1036.
- [19] DUTERTRE S, NICKE A, TSETLIN V I. Nicotinic acetylcholine receptor inhibitors derived from snake and snail venoms [J]. *Neuropharmacology*, 2017, 127: 196 – 223.
- [20] DUTTON J L, BANSAL P S, HOGG R C, et al. A new level of conotoxin diversity, a non-native disulfide bond connectivity in alpha-conotoxin AuIB reduces structural definition but increases biological activity [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(50): 48849 – 48857.
- [21] LEBBE E K M, STEVE P, WIJESEKARA I, et al. Conotoxins targeting nicotinic acetylcholine receptors: An overview [J]. *Marine Drugs*, 2014(12): 2970 – 3004.
- [22] ELLISON M, FENG Z P, PARK A J, et al. α -RgIA, a novel conotoxin that blocks the $\alpha 9\alpha 10$ nAChR: Structure and identification of key receptor-binding residues [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 377(4): 1216 – 1227.
- [23] ZHU X, PAN S, XU M, et al. High selectivity of an α -conotoxin LvIA analogue for $\alpha 3\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors is mediated by $\beta 2$ functionally important residues [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2020, 63(22): 13656 – 13668.
- [24] LÓPEZ-VERA E, JACOBSEN R B, ELLISON M, et al. A novel alpha conotoxin (α -PIB) isolated from *C. purpurascens* is selective for skeletal muscle nicotinic acetylcholine receptors [J]. *Toxicon*, 2007, 49(8): 1193 – 1199.
- [25] FANG G M, CHEN X X, YANG Q Q, et al. Discovery, structure, and chemical synthesis of disulfide-rich peptide toxins and their analogs [J]. *Chinese Chemical Letters*, 2018, 29(7): 1033 – 1042.
- [26] GAO F, CHEN D, MA X, et al. Alpha6-containing nicotinic acetylcholine receptor is a highly sensitive target of alcohol [J]. *Neuropharmacology*, 2019, 149: 45 – 54.

- [27] JULIEN G, SEBASTIEN D. α -conotoxins to explore the molecular, physiological and pathophysiological functions of neuronal nicotinic acetylcholine receptors [J]. *Neuroscience Letters*, 2018, 679: 24 – 34.

Synthesis of new analogs of α -conotoxin LvIA mutated at the position 11 residue and their target activity

LI Haonan^{1,2}, YANG Yishuai², ZHANG SUN Dongting², ZHU Xiaopeng², LUO Sulan²

(1. Department of Pharmacy, Sanya City Womenfolk & Infant Health Care Hospital, Shanghai Children's Medical Center, Sanya, Hainan 572000;

2. Ministry of Education Key Laboratory of Tropical Biological Resources/ Haikou Key Lab for Marine Drug/ School of Life Sciences and Pharmacy, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: α -snail toxin LvIA is a small peptide targeting $\alpha 3\beta 2$ acetylcholine receptor (nAChR), which was found in the South China Sea snail. The structure and function of LvIA were previously analyzed in our laboratory. After alanine scanning mutation it was found that the mutant [D11A] LvIA, which was replaced by alanine (A) with aspartic acid at the site 11 of LvIA, maintained its activity against $\alpha 3\beta 2$ nAChR. In order to further explore the effect of the properties of amino acid at the position 11 on the binding activity of LvIA target, two new mutants of LvIA [D11R] LvIA and [D11H] LvIA were designed, namely, two basic amino acids - arginine (R) and histidine (H) were used to replace the original acid amino acid D, respectively. The linear peptides of the two new mutants were synthesized and then folded by a two-step oxidation method to obtain a disulfide bond between the first and third cysteines (Cys 1-3) and the second and fourth cysteines (Cys 2-4). The peptides containing Cys (1-3, 2-4) disulfide bond were successfully synthesized by high performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry. The synthesized peptides were correct in molecular weight and their purity was above 95%. The binding activity of these two mutants to $\alpha 3\beta 2$ nAChR was detected by two-electrode voltage clamp electrophysiology. The results showed that when the amino acid properties of the site were changed from acidic to alkaline, LvIA activity was greatly affected, resulting in direct loss of $\alpha 3\beta 2$ nAChR blocking activity. The activity of [D11R] LvIA and [D11H] LvIA was 574.38% and 408.62% lower than that of wild-type LvIA, respectively. This suggests that the acidity and basicity of the 11th amino acid is crucial to the activity of LvIA. These results provide some reference for the optimization design and modification of LvIA in the future, based on which it is expected to obtain more specific peptide tools targeting $\alpha 3\beta 2$ nAChR, which can provide a better pharmacological molecular probe for the study of the structure, function and distribution of an $\alpha 3\beta 2$ nAChR receptor.

Keywords: α -conotoxin LvIA; mutant design and synthesis; $\alpha 3\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor; target binding activity; electrophysiological technique.

(责任编辑:潘学峰)