

## 芋螺毒素 ImI 的化学合成及其杀虫活性研究

吴小英<sup>1</sup>, 安婷婷<sup>2</sup>, 高炳淼<sup>3\*</sup><sup>1</sup>海南省人民医院; <sup>2</sup>海南省药物研究所, 海口 570311; <sup>3</sup>海南医学院, 海口 571199

**摘要:**为研究芋螺毒素 ImI 的杀虫活性, 本研究采用化学方法合成芋螺毒素线性肽, 经氧化折叠后质谱鉴定获得芋螺毒素 ImI, 采用 MTT 法和昆虫注射法研究其杀虫活性。结果表明采用化学合成法可以成功合成芋螺毒素线性肽, 经氧化折叠后质谱鉴定形成 2 个二硫键; 活性实验表明芋螺毒素 ImI 具有抑制昆虫细胞 s9 生长的活性, 半数有效量为 0.13 nM; 对黄粉虫具有杀虫活性, 半数致死剂量为 0.11 μg/mg。通过化学合成法可以有效合成芋螺毒素 ImI, 其具有良好的杀虫活性, 可为研发新型多肽类生物杀虫剂奠定基础。

**关键词:** 芋螺毒素; 化学合成; 氧化折叠; 杀虫活性

中图分类号: R931

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.12.026

## Chemical Synthesis and Insecticidal Activity of Conotoxin ImI

WU Xiao-ying<sup>1</sup>, AN Ting-ting<sup>2</sup>, GAO Bing-miao<sup>3\*</sup><sup>1</sup>Hainan General Hospital; <sup>2</sup>Pharmaceutical Institute of Hainan Province, Haikou 570311, China; <sup>3</sup>Hainan Medical University, Haikou 571199, China

**Abstract:** To study insecticidal activity of Conotoxin ImI, the conotoxin linear peptide was synthesized by chemical method, and conotoxin ImI was identified by mass spectrometry after oxidative folding. The insecticidal activity of conotoxin was evaluated by MTT method and insect injection method. The results show that conotoxins linear peptides were successfully synthesized by chemical synthesis method, and two disulfide bonds were identified by mass spectrometry after oxidative folding. The activity test showed conotoxin ImI could inhibit the growth of s9 in insect cells, and the half effective dose was 0.13 nM. It had a killing effect on *Tenebrio molitor*, with a median lethal dose was 0.11 μg/mg. Therefore, the conotoxin ImI can be synthesized by chemical synthesis, which has the insecticidal activity and can lay the foundation for the development of new peptide bio-pesticides.

**Key words:** conotoxin; chemical synthesis; oxidative folding; insecticidal activity

芋螺 (Cone Snail) 主要生长于热带海域, 属于软体动物门, 腹足纲, 芋螺科, 是在沿海珊瑚礁、沙滩上生活的美丽的螺类<sup>[1]</sup>。芋螺毒素 (conotoxins) 是来源于芋螺毒管中用于捕猎的一类多肽的集合, 其具有丰度高、分子量小、结构多样、靶点广泛、特异性强等特点, 已经逐渐成为国内外极受关注的新兴研究热点<sup>[2,3]</sup>。全世界约有 500 种以上芋螺, 根据芋螺食性可分为三大类: 食虫芋螺 (大于 350 种), 食螺芋螺 (约 70 种), 食鱼芋螺 (约 70 种)<sup>[4,5]</sup>。我国芋螺约有 80 余种, 主要分布在海南省管辖的西沙群岛、南沙群岛和中沙群岛, 以及台湾岛等热带海区<sup>[6]</sup>。至今, 已从数百种芋螺中分离到了上千种芋

螺毒素, 其在镇痛、癫痫治疗、癌症、戒烟戒毒、疾病诊断和受体研究中具有广泛的应用价值<sup>[7]</sup>。部分芋螺毒素已进入临床研究或已被 FDA 正式批准为治疗新药, 用作特异诊断试剂和镇痛药<sup>[8]</sup>。如由 Olivera 等从幻芋螺 (*Conus magus*) 中分离的 ω-MVI-IA, 已被美国 FAD 正式批准为治疗顽痛的药物, 其商品名为 Ziconotide<sup>[9]</sup>。

随着化学杀虫剂的普遍使用, 农业害虫的耐药性不断增加, 导致杀虫剂毒性和使用量都越来越大, 生态环境受到巨大伤害, 进而严重威胁着人类健康, 由此对新型、高效、安全生物杀虫剂的需求非常迫切<sup>[10,11]</sup>。食虫芋螺毒素能够特异性作用于昆虫而具有较强的杀虫能力, 对哺乳动物的毒性很小或无毒副作用, 而食虫芋螺毒素的杀虫活性和作用靶点尚未开展系统研究<sup>[12]</sup>。因此, 开展食虫芋螺毒素的研究, 筛选获得高效杀虫芋螺毒素, 为解决化学农药

收稿日期: 2018-01-09 接受日期: 2018-04-17

基金项目: 海南省重点研发计划 (ZDYF2018138); 国家自然科学基金 (81560611)

\* 通信作者 Tel; E-mail: gaobingmiao@hainmc.edu.cn

造成的生态环境问题提供一条新途径。本研究化学合成了芋螺毒素线性肽 ImI, 经两步氧化法后质谱鉴定获得氧化折叠肽 ImI, 采用 MTT 法和昆虫注射法测试其杀虫活性, 可为研发新型、高效、安全生物杀虫剂奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

多肽合成相关氨基酸活化试剂 (ABI, 美国); 色谱级三氟乙酸 (Trifluoroacetic acid, TFA) 和色谱级乙腈 (Acetonitrile, ACN), 购自 Thermo Fisher Scientific 公司; Vydac 分析型 C<sub>18</sub> 柱 (5 μm, 4.6 mm × 250 mm) 及制备型 C<sub>18</sub> 柱 (10 μm, 22 mm × 250 mm), 购于上海申越实验器材有限公司。其他常用生化试剂均为国产分析纯, 购自广州化学试剂厂。

### 1.2 实验仪器

多肽合成仪 (ABI 433, 美国); 高效液相色谱仪 (Waters2535, 美国); 电喷雾电离质谱 (岛津, 日本); 冷冻干燥机 (Christ, 德国)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 线性肽的合成

芋螺毒素 ImI 线性肽 (GCCSDPRCAWRC-NH<sub>2</sub>) 的合成参照文献<sup>[12]</sup>的方法, 采用 Fmoc 化学方法合成 ImI 的线性肽, 树脂为 Wang Resin, 从 C 端至 N 端合成, HBTU/HOBt/DIEA 缩合形成肽键。合成过程中非半胱氨酸的侧链保护基团如下所示: Ser (tBu), Asp (OtBu), Arg (Pbf), Trp (Boc)。半胱氨酸 Cys 1 和 Cys 3 用 S-Trityl (Trt) 保护基团, Cys 2 和 Cys 4 用 S-acetamidomethyl (Acm) 保护基团。树脂肽合成后, 按照每 20 mg 的树脂肽 1 mL 试剂 K (82.5% TFA/5% phenol/5% H<sub>2</sub>O/5% Thioanisole/2.5% EDT, v/v) 切割 (室温 2 h), 过滤并用 20 倍体积的 -20 °C 冰乙醚沉淀和洗涤回收线性肽粗品, 进行 HPLC 纯化, 采用 Vydac C<sub>18</sub> 柱: 流动相 A (水, 0.1% TFA), 流动相 B (乙腈, 0.1% TFA); 流速 12 mL/min; 60 min 线性梯度洗脱, B 相 20% 至 80%, 检测波长 214 nm。经过 HPLC 反复纯化后获得线性肽, 分析型 HPLC 分析其纯度达 95% 以上, 通过质谱鉴定无误后, 进行冻干保存, 用于后续的氧化折叠反应。

#### 1.3.2 两步法氧化折叠

第一步氧化, 将纯化后线性肽溶于铁氰化钾反应液 (K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 10 mmol/L, Tris 0.1 mol/L, pH 7.5) 中促使形成第一对二硫键 (Cys1 和 Cys3), 线

性肽浓度不高于 50 mg/mL, 室温氧化折叠 45 min。HPLC 纯化反应后的产物, 并进行质谱鉴定。第二步氧化, 将纯化的产物加入充入氮气保护的碘 (I<sub>2</sub>) 反应液中 (7.5 mmol/L I<sub>2</sub> 溶液; 水/TFA/乙腈 = 73:3:24, V/V), 反应 5 ~ 10 min, 加抗坏血酸至溶液颜色消失, 形成第二对二硫键 (Cys2 和 Cys4) 得到 ImI 最终活性产物。采用 HPLC 对合成的产物纯化并进行质谱确认。

#### 1.3.3 MTT 法

取对数期生长的 Sf9 细胞, 用细胞计数板计数, 按每孔 100 μL 接种于 96 孔板中, 每孔细胞数量控制在 10<sup>3</sup> 个左右, 27 °C 培养至细胞完全贴壁后, 分别加入不同浓度的芋螺毒素纯品, 每组各设置 3 个复孔, 以不加抑制剂的实验组作对照。27 °C 条件下培养 48 h 后, 每孔加入浓度为 5 mg/mL 的 MTT (3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐) 10 μL, 继续培养 4 h。弃去板中培养液及 MTT, 每孔加入 100 μL DMSO (二甲基亚砜), 室温低速震荡 15 min。待结晶物完全溶解后, 在酶标免疫测定仪测定 490 nm 处的吸光度值。

#### 1.3.4 昆虫注射法

选用 3 龄或 4 龄的黄粉虫 (约 180 mg/条), 注射前采用鸡饲料正常喂食。在实验当天将芋螺毒素溶解在 0.7% 盐水中至所需浓度, 使用微注射器 (气相尖头微量进样器, 10 μL, 上海高鸽) 进行注射, 注射体积为 5 μL, 用 10 μL 0.7% 盐水冲洗导管死腔中残留药物。将溶解的芋螺毒素分别以不同浓度注射到黄粉虫体内 (n = 10)。用 0.7% 盐水溶液注射对照组黄粉虫 (n = 10), 每个浓度做三次重复。在 48 小时观察注射芋螺毒素或 0.7% 盐水的黄粉虫死亡情况。

#### 1.3.5 数据处理

数据处理和分析采用统计软件 GraphPad Prism6, 数据以 mean ± SD 表示, 两组间数据分析比较采用 *t* 检验。\* 表示差异显著 (*P* < 0.05), \*\* 表示差异极显著 (*P* < 0.01)。

## 2 结果

### 2.1 线性肽的合成

采用化学方法合成了 ImI 线性肽, 对粗肽进行 HPLC 纯化 (见图 1)。ImI 线性肽的洗脱时间为 9.653 min, 最终得到纯度为 95% 的线性肽约 20.2 mg。

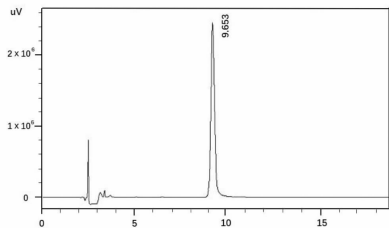


图1 HPLC 纯化线性肽 ImI

Fig. 1 HPLC Purification of linear peptide ImI

## 2.2 氧化折叠

利用铁氰化钾溶液和  $I_2$  溶液对合成的线性肽 ImI 进行两步法氧化折叠,并对氧化折叠终产物进行 HPLC 纯化和质谱鉴定。树脂切割后的线性肽分子量为 1497.78 Da,符合含有 AcM 保护基团的 ImI 分子量。经第一步氧化后的分子量为 1495.78 Da,与氧化前相比少了 2 Da,证明第一对二硫键形成。第二步氧化折叠后质谱鉴定 ImI 分子量为 1351.58 Da,与第一步氧化后的分子量相差 144.2 Da,证明第二步氧化折叠是切割两个 AcM 保护基团并形成了第二对二硫键(如图 2)。再与其线性肽的分子量 1355.634 Da 相差约 4 Da,亦证明脱去 4 个氢原子形成了两对二硫键。通过两步氧化法最终从 20.2 mg 线性肽 ImI 中获得活性产物约 9.75 mg,产率为 48.3%。

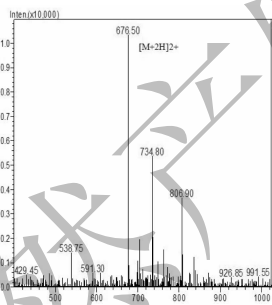


图2 氧化折叠后 ImI 的质谱鉴定

Fig. 2 Identification of oxidative folding ImI by mass spectrometry

## 2.3 MTT 法

通过 MTT 法测试芋螺毒素 ImI 对昆虫细胞 sf9 的抑制作用。实验结果(图 3)表明,与对照组(0.7% NaCl 溶液)相比,实验组均具有显著性差异。芋螺毒素 ImI 对昆虫细胞 sf9 的抑制效果具有剂量效应,半数有效量为 0.13 nM。

## 2.4 昆虫注射法

不同浓度的芋螺毒素 ImI 被注射到黄粉虫的腹

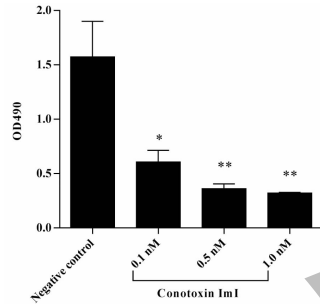


图3 芋螺毒素 ImI 对昆虫细胞 sf9 的抑制作用

Fig. 3 Inhibitory effects of conotoxin ImI on growth of insect sf9 cells

注:测试组对比于阴性对照组,\*表示具有显著性差异(\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ )。

Note:Compared with the negative control group,the test group showed significant difference(\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ).

部来评价其杀虫作用。图 4 可以看出空白对照和阴性对照组致死率均为 0,表明注射法模型对于评价杀虫作用是可行的。随着芋螺毒素 ImI 的注射量的增加,对昆虫的致死率从 16.6% 到 66.7%,经计算黄粉虫的半数致死剂量为 0.11  $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。

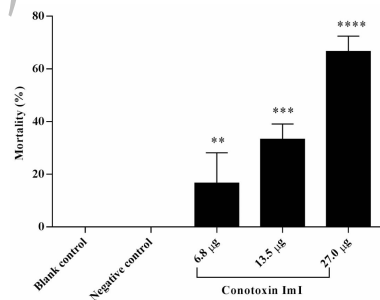


图4 芋螺毒素 ImI 对黄粉虫的杀虫作用

Fig. 4 Insecticidal effects of conotoxin ImI

注:测试组对比于阴性对照组,\*表示具有显著性差异(\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ ,\*\*\*\* $P < 0.0001$ )。

Note:the test group was compared with the negative control group and \* indicated significant difference (\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ ,\*\*\*\* $P < 0.0001$ ).

## 3 讨论

随着化学杀虫剂的普遍使用,农业害虫的耐药性不断增加,导致杀虫剂毒性和使用量都越来越大,食品安全和环境生态问题频现,进而严重威胁着人类健康<sup>[13]</sup>。虽然采取了禁用高毒农药等措施,但也将出现可替代新农药品种缺乏等诸多问题。因此,对新型、高效、安全的生物杀虫剂的需求非常迫切。

乙酰胆碱受体 (nAChR) 是脊椎动物和无脊椎动物神经系统中快速介导胆碱能突触传递的配基门控离子通道<sup>[14]</sup>。在昆虫中, nAChR 在神经肌肉接头处没有分布, 却是中枢神经系统中最为丰富的神经递质受体, 因此成为杀虫剂的作用靶标<sup>[15]</sup>。John Moon 等采用注射法将重组肽 Tgu6.1 注射到多毛虫中枢神经索部位, 来鉴定杀虫活性<sup>[16]</sup>。Monica Mejia 等<sup>[17]</sup>开发一种使用果蝇注射和电生理记录的筛选芋螺毒素的新方法。芋螺毒素 ImI 是来源于食虫帝王芋螺 (*Conus imperialis*), 具有 4 个半胱氨酸形成 2 个二硫键, 其作用靶点为  $\alpha 7$ -nAChR, 我们推测其具有杀虫活性<sup>[18,19]</sup>。采用化学方法合成芋螺毒素线性肽, 经氧化折叠后质谱鉴定获得芋螺毒素 ImI, 采用 MTT 法和昆虫注射法研究其杀虫活性。实验结果表明芋螺毒素 ImI 具有抑制昆虫细胞 s9 生长的活性, 半数有效量为 0.13 nM; 对黄粉虫具有杀虫活性, 半数致死剂量为 0.11  $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。

目前认为多肽类毒素发挥杀虫作用的第一作用靶标为 nAChR, 但没有发现其具体作用位点。近年来, 对果蝇、桃蚜、烟草天蛾等昆虫的 nAChR 进行了分子克隆和功能鉴定, 为杀虫剂作用机理及抗性机制的研究提供分子基础<sup>[20]</sup>。多肽类毒素类杀虫剂作用于昆虫神经传导的突触部位, 与乙酰胆碱竞争受体位点, 占领受体位点后, 抑制神经兴奋的传导, 造成昆虫麻痹, 最终死亡<sup>[21]</sup>。因此, 以 nAChR 作为靶标来研发新型杀虫剂需要加以重视, 搞清楚芋螺毒素如何特异性作用于昆虫 nAChR 各种亚基的作用位点, 从本质上揭示其杀虫作用机制, 以进行杀虫剂的合理设计和高通量筛选, 创制出新型生物杀虫剂, 提高其在害虫防治中的应用价值将是进一步需要开展的工作。

## 参考文献

- Prashanth JR, Brust A, Jin AH, *et al.* Cone snail venomics: from novel biology to novel therapeutics [J]. *Future Med Chem*, 2014, 6:1659-1675.
- Himaya SW, Jin AH, Dutertre S, *et al.* Comparative Venomics Reveals the Complex Prey Capture Strategy of the Piscivorous Cone Snail *Conus catus* [J]. *J Proteome Res*, 2015, 14:4372-4381.
- Gao B, Zhangsun D, Wu Y, *et al.* Expression, renaturation and biological activity of recombinant conotoxin GeXIVAWT [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97:1223-1230.
- Prashanth JR, Dutertre S, Jin AH, *et al.* The role of defensive ecological interactions in the evolution of conotoxins [J]. *Mol Ecol*, 2016, 25:598-615.
- Robinson SD, Norton RS. Conotoxin gene superfamilies [J]. *Mar Drugs*, 2014, 12:6058-101.
- Gao B, Peng C, Yang J, *et al.* Cone snails: a big store of conotoxins for novel drug discovery [J]. *Toxins*, 2017, 9:397.
- Vetter I, Lewis RJ. Therapeutic potential of cone snail venom peptides (conopeptides) [J]. *Curr Top Med Chem*, 2012, 12:1546-1552.
- Wilson MJ, Zhang MM, Azam L, *et al.* Navbeta subunits modulate the inhibition of Nav1.8 by the analgesic gating modifier muO-conotoxin MrVIB [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011, 338:687-693.
- Hussar DA. New drugs: tigecycline, ziconotide, and clofarabine [J]. *J Am Pharm Assoc*, 2005, 45:636-639.
- Haase S, Sciocco-Cap A, Romanowski V. Baculovirus insecticides in Latin America: historical overview, current status and future perspectives [J]. *Viruses*, 2015, 7:2230-2267.
- Liu J (刘俊霞), Dou F (窦凤鸣), Wang Y (王英平). Insecticidal components of Ligands in stems of *Schisandra chinensis* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2017, 29:1210-1217.
- Gao B, Peng C, Lin B, *et al.* Screening and validation of highly-efficient insecticidal conotoxins from a transcriptome-based dataset of Chinese tubular cone snail [J]. *Toxins*, 2017, 9:214.
- Wu Y (吴勇), Xu P (徐盼), Ren J (任洁), *et al.* Study on oxidative folding pathway of  $\alpha$ -conotoxin TxIB [J]. *Chin J Mar Drugs* (中国海洋药物), 2016, 35:65-70.
- Khan SA, Zafar Y, Briddon RW, *et al.* Spider venom toxin protects plants from insect attack [J]. *Transgen Res*, 2006, 15:349-357.
- Zhangsun D (长孙东亭), Wu Y (吴勇), Zhu XP (朱晓鹏), *et al.* Hainan  $\alpha$ -conotoxins target nicotinic acetylcholine receptors [J]. *Chin Bull Life Sci* (生命科学), 2016, 28:12-21.
- Moon J, Gorson J, Wright ME, *et al.* Characterization and recombinant expression of terebrid venom peptide from *Terebra guttata* [J]. *Toxins*, 2016, 8:1-12.
- Mejia M, Heghinian MD, Busch A, *et al.* A novel approach for *in vivo* screening of toxins using the Drosophila Giant Fiber circuit [J]. *Toxicon*, 2010, 56:1398-1407.
- Dekan Z, Vetter I, Daly NL, *et al.* alpha-Conotoxin ImI incorporating stable cystathionine bridges maintains full potency and identical three-dimensional structure [J]. *J Am Chem Soc*, 2011, 133:15866-15869.