

北京交通大学

硕士学位论文

E型肉毒毒素结构域的功能活性与作用机制研究

Study on the functional activity and mechanism of botulinum  
neurotoxin serotype E domains

作者：谈肖

导师：徐青 副教授

北京交通大学

2023年6月

学校代码：10004

密级：公开

# 北京交通大学

## 硕士学位论文

E型肉毒毒素结构域的功能活性与作用机制研究

Study on the functional activity and mechanism of botulinum  
neurotoxin serotype E domains

作者姓名：谈肖

学 号：20121612

导师姓名：徐青

职 称：副教授

学位类别：理学

学位级别：硕士

学科专业：生物学

研究方向：生物毒素

北京交通大学

2023年6月

## 摘要

**研究目的：**肉毒毒素是一种强的神经毒素蛋白，可分为 A-G 七种血清型，其中 A、B、E 和 F 可导致人类中毒，但肉毒毒素也可作为一种治疗性药物。然而，目前对于 E 型肉毒毒素结构域的功能及作用机制的相关研究不够深入。因此本研究通过探究跨膜结构域（HN）和结合结构域（Hc）在 E 型肉毒毒素发挥神经毒性效应中的作用以及分析单链和双链 E 型肉毒毒素分子效应的异同点，进而明确 E 型肉毒毒素结构域的功能与作用机制。本研究将为 E 型肉毒毒素的基础研究提供理论数据。

**研究方法：**本研究以 E 型肉毒毒素为主要对象，通过分析 EL-HN 等分子在蛋白和细胞水平切割底物蛋白突触体相关蛋白 25（SNAP25）的效率及其在小鼠体内的毒力来分析各功能分子的活性及特性；通过 ELISA 和 pull down 等实验技术验证 E 型肉毒毒素与突触囊泡蛋白 2C（SV2C）的结合情况；利用点突变的方法构建 E 型肉毒毒素激活环形区（activation loop）突变体分子并通过体内和体外实验研究各突变体分子的生物学活性，进而探究单链和双链 E 型肉毒毒素的效应差异及相关机制。

**研究结果：**

（1）缺失 Hc 结构域的 EL-HN 分子能够在蛋白和细胞水平切割底物蛋白 SNAP25，并且其在小鼠体内的神经毒力要高于 AL-HN、BL-HN 和 FL-HN，半数致死剂量（LD<sub>50</sub>）为 0.5 μg/只。E 型肉毒毒素的 HN 结构域具有与 SV2C 结合的活性。

（2）成功制备 SV2B（L4）蛋白，ELISA 实验结果表明 E 型肉毒毒素与 SV2B 及 SV2C 的结合活性相当，pull down 实验结果表明 E 型肉毒毒素具有与 SV2C 结合的活性，并且 E 型肉毒毒素可切割 SH-SY5Y 及 neuro-2a 细胞中的 SNAP25。

（3）利用基因工程技术生物合成了 3 种 E 型肉毒毒素激活环形区突变体分子，确定突变体分子为无二硫键形成的单链 E 型肉毒毒素。突变体分子在蛋白和细胞水平仍能够切割 SNAP25，而在动物体内，其神经毒力虽与未突变的双链毒素相比有所降低，但仍然较强。

**结论：**

（1）EL-HN 分子在体内和体外均具有强的生物活性，HN 可介导肉毒毒素与神经细胞潜在受体 SV2C 的结合，提示 EL-HN 可作为研究肉毒毒素跨膜转运的模式分子。

(2) 首次发现 E 型肉毒毒素在体外可与 SV2C 结合, 并且能结合并进入仅表达 SV2C 的 neuro-2a 细胞中发挥蛋白酶活性。以上结果提示在无 SV2A 和 SV2B 条件下, E 型肉毒毒素可通过补偿受体 SV2C 结合并进入细胞。

(3) 单链 E 型肉毒毒素和其激活环形区突变体分子具有较强的体内外活性, 可发挥相应的神经毒性效应, 表明单链 E 型肉毒毒素可通过不依赖双链结构的机制进入神经细胞发挥作用。

**关键词:** E 型肉毒毒素; 结构域; 功能活性; 激活环形区; 作用机制

## ABSTRACT

**Objective:** Botulinum neurotoxin is a neurotoxin protein that can be divided into A-G seven types, among which A, B, E, and F can cause human poisoning, but botulinum neurotoxin can also be used as a therapeutic drug. At present, the research on the function and mechanism of the domain of botulinum neurotoxin serotype E is not in-depth. Therefore, this study aims to clarify the function and mechanism of botulinum toxin type E by exploring the role of the transmembrane domain (HN) and receptor binding domain (Hc) in the neurotoxicity of botulinum neurotoxin serotype E, and analyzing the similarities and differences in the molecular effects of single chain and di-chain botulinum neurotoxin serotype E. These studies will provide theoretical data for the basic research of botulinum neurotoxin serotype E.

**Methods:** In this study, the activity and characteristics of each functional molecule of botulinum neurotoxin serotype E was investigated by the efficiency of cleaving the synaptosome protein 25 (SNAP25) at the protein and cell levels and virulence in mice. The binding of botulinum neurotoxin serotype E to synaptic vesicle protein 2C (SV2C) was verified by ELISA and pull down. The point mutation method was used to construct the mutant molecule of the activation loop of botulinum neurotoxin serotype E and the biological activity of each mutant molecule was studied in vivo and in vitro experiments, then the effect difference and related mechanism between single-chain and di-chain botulinum neurotoxin serotype E were explored.

**Results:**

(1) The EL-HN, which has no Hc domain, can cleave the substrate protein SNAP25 at the protein and cell levels, and its neurovirulence in mice is higher than that of AL-HN, BL-HN and FL-HN. The median lethal dose (LD<sub>50</sub>) of EL-HN was 0.5 μg/mouse. The HN domain of botulinum neurotoxin serotype E has the activity of binding to SV2C.

(2) The SV2B (L4) was successfully prepared. ELISA experiments showed that the binding activity of botulinum neurotoxin serotype E to SV2B and SV2C was comparable. Pull down experiments showed that botulinum neurotoxin serotype E had binding activity to SV2C, and botulinum neurotoxin serotype E could cleave SNAP25 in SH-SY5Y and neuro-2a cells.

(3) Three mutant molecules of the activation loop of botulinum neurotoxin serotype E were prepared by genetic engineering technology. The mutant molecules were

determined to be single chain botulinum neurotoxin serotype E without disulfide bond formation. These single chain toxins can still cleave SNAP25 at the protein and cell levels. In animals, although their neurovirulence is reduced compared with the di-chain toxin, their neurotoxicity is still strong.

Conclusion:

(1) EL-HN has strong biological activity in vivo and in vitro. HN can mediate the binding of botulinum neurotoxin to the potential receptor SV2C on nerve cells. These results suggest that EL-HN can be used as a model molecule for studying the transmembrane transport of botulinum neurotoxin.

(2) For the first time, it was found that botulinum neurotoxin serotype E can bind to SV2C in vitro, and botulinum neurotoxin serotype E can enter neuro-2a cells that only express SV2C and can cleave the substrate protein SNAP25. In the absence of SV2A and SV2B, botulinum neurotoxin serotype E may bind to and enter nerve cells by compensating receptor SV2C.

(3) The single chain botulinum neurotoxin serotype E and its activation loop mutant molecules have strong activity in vivo and in vitro, and can exert neurotoxic effects, which indicates that single chain botulinum neurotoxin serotype E can enter nerve cells through a mechanism independent of di-chain structure.

**KEYWORDS:** BoNT/E; domain; functional activity; activation loop; mechanism

# 目 录

1 引言.....	1
1.1 肉毒毒素概述.....	1
1.2 肉毒毒素的结构和发挥神经毒性的过程 .....	1
1.2.1 肉毒毒素的结构.....	1
1.2.2 肉毒毒素发挥神经毒性的过程.....	2
1.3 肉毒毒素的医学应用.....	3
1.4 E 型肉毒毒素 .....	4
1.5 研究目的及意义.....	6
1.6 方法和技术路线.....	6
2 EL-HN 分子的生物学活性和作用研究 .....	8
2.1 实验材料.....	8
2.1.1 主要仪器.....	8
2.1.2 实验试剂.....	9
2.1.3 溶液配制.....	11
2.1.4 实验动物.....	13
2.1.5 PCR 引物与基因 DNA 片段的合成 .....	13
2.2 实验方法.....	15
2.2.1 表达载体的构建.....	15
2.2.2 目的蛋白的制备及鉴定.....	17
2.2.3 胰蛋白酶缺刻 EL-HN 制备双链分子 .....	18
2.2.4 蛋白水平测定 EL-HN 的蛋白酶活性 .....	18
2.2.5 EL-HN 等蛋白切割 SNAP25 的 C 端测序.....	19
2.2.6 细胞水平检测 EL-HN 的活性.....	19
2.2.7 小鼠体内的半数致死量(LD <sub>50</sub> )的测定 .....	19
2.2.8 ELISA 法检测 EL-HN 分子与 SV2C(L4)的结合 .....	20
2.2.9 细胞免疫荧光分析 EL-HN 与 neuro-2a 细胞的结合 .....	20
2.2.10 细胞学阻断实验.....	20
2.2.11 统计学分析 .....	21
2.3 结果.....	21
2.3.1 重组质粒表达载体的构建.....	21
2.3.2 各目的蛋白的表达纯化及鉴定.....	23
2.3.3 双链 EL-HN 的制备.....	26
2.3.4 EL-HN 分子在蛋白水平的活性.....	27
2.3.5 EL-HN 等蛋白切割 SNAP25 位点的 C 端测序 .....	28

2.3.6 EL-HN 分子在细胞水平的活性.....	30
2.3.7 EL-HN 分子在小鼠体内的活性.....	31
2.3.8 EL-HN 分子与 SV2C(L4)的结合能力.....	32
2.3.9 EL-HN 和 neuro-2a 的结合作用分析 .....	33
2.3.10 过量 HN 和 SV2C 抑制 EL-HN 蛋白切割细胞 SNAP25 .....	34
2.4 分析及讨论.....	36
2.5 小结.....	38
3 E 型肉毒毒素与 SV2C 的结合作用研究 .....	39
3.1 实验材料.....	39
3.1.1 主要仪器.....	39
3.1.2 实验试剂.....	39
3.1.3 溶液配制.....	40
3.1.4 片段与引物的合成.....	41
3.2 实验方法.....	43
3.2.1 原核表达载体的构建.....	43
3.2.2 真核表达载体的构建.....	43
3.2.3 目的蛋白在原核表达系统的表达.....	43
3.2.4 目的蛋白在真核表达系统的瞬时表达 .....	43
3.2.5 带 Twin Strep 标签蛋白的纯化.....	44
3.2.6 Mabselct 亲和层析法纯化目的蛋白 .....	44
3.2.7 ELISA 法检测 E 型肉毒毒素与 SV2C 的结合 .....	44
3.2.8 蛋白互作-pull down 检测 E 型肉毒毒素与 SV2C 的结合 .....	44
3.2.9 细胞水平检测 E 型肉毒毒素的活性 .....	45
3.2.10 统计学分析.....	45
3.3 实验结果.....	45
3.3.1 Trx-SV2B(L4)的表达.....	45
3.3.2 真核系统表达目的蛋白.....	46
3.3.3 ELISA 法检测 E 型肉毒毒素与 SV2C 的结合 .....	48
3.3.4 蛋白互作-pull down 检测 E 型肉毒毒素与 SV2C 的结合 .....	49
3.3.5 SV2 糖基化和非糖基化对 E 型肉毒毒素结合的影响.....	51
3.3.6 E 型肉毒毒素在不同细胞模型中的活性 .....	52
3.4 分析及讨论.....	53
3.5 小结.....	54
4 E 型肉毒毒素激活环形区的作用研究.....	56
4.1 实验材料.....	56

4.1.1 主要仪器.....	56
4.1.2 实验试剂.....	56
4.1.3 溶液的配制.....	56
4.1.4 实验动物.....	57
4.1.5 片段与引物的合成.....	57
4.2 实验方法.....	57
4.2.1 质粒的构建.....	57
4.2.2 目的蛋白的表达纯化.....	59
4.2.3 胰蛋白酶切割实验.....	59
4.2.4 蛋白水平测突变体分子的活性.....	59
4.2.5 细胞水平测突变体分子的活性.....	59
4.2.6 小鼠体内的 LD <sub>50</sub> 测定.....	59
4.2.7 统计学分析.....	60
4.3 实验结果.....	60
4.3.1 突变体质粒表达载体的构建.....	60
4.3.2 目的蛋白的表达纯化.....	61
4.3.3 胰蛋白酶切割 BoNT/E 突变体蛋白.....	62
4.3.4 突变体分子在蛋白水平的活性.....	63
4.3.5 突变体分子在细胞水平的活性.....	66
4.3.6 突变体分子在小鼠体内的活性.....	68
4.4 讨论.....	69
4.5 小结.....	71
5 结论与展望.....	72
5.1 结论.....	72
5.2 展望.....	72
参考文献.....	73

## 图目录

图 1-1 肉毒毒素的结构示意图 .....	1
图 1-2 肉毒毒素的作用机制 .....	3
图 1-3 BoNT/A、BoNT/B 和 BoNT/E 的晶体结构 .....	5
图 1-4 SV2 蛋白示意图 .....	5
图 1-5 技术路线 .....	7
图 2-1 EL-HN 示意图 .....	8
图 2-2 重组表达载体的鉴定 .....	22
图 2-3 pTIG-Trx-SV2C (L4) -His 的双酶切鉴定 ( <i>EcoRI</i> 和 <i>XhoI</i> ) .....	23
图 2-4 EL-HN 表达与纯化后的 SDS-PAGE 鉴定 .....	23
图 2-5 SNAP25 表达与纯化后的 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定 .....	24
图 2-6 Trx-SV2C (L4) 纯化后 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定 .....	25
图 2-7 Trx-EHN <sub>423-699</sub> 和 Trx-EHN <sub>700-840</sub> 的 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定 .....	26
图 2-8 双链 EL-HN 分子的制备 .....	27
图 2-9 蛋白水平蛋白酶活性实验 .....	28
图 2-10 各分子切割 SNAP25 的 C 端测序结果 .....	30
图 2-11 EL-HN 切割 neuro-2a 中的 SNAP25 鉴定结果 .....	31
图 2-12 肉毒毒素相关蛋白的结合活性检测 .....	33
图 2-13 免疫荧光检测 EL-HN 和 neuro-2a 的相互作用 .....	34
图 2-14 EL-HN-DC 结合活性的抑制实验 .....	35
图 2-15 研究结果示意图 .....	38
图 3-1 pTIG-Trx-SV2B (L4) -Twin Strep-tag 纯化后 SDS-PAGE 鉴定 .....	45
图 3-2 SV2C <sub>459-578</sub> -Twin strep 的 SDS-PAGE 鉴定 .....	46
图 3-3 SV2C <sub>459-578</sub> -Fc 的 SDS-PAGE 鉴定 .....	47
图 3-4 E 型肉毒毒素与 SV2 的结合活性检测 .....	49
图 3-5 Pull down 实验检测 E 型肉毒毒素和 SV2C 的结合 .....	50
图 3-6 SV2C (L4) -Fc 与 BoNT/E 的结合 .....	51
图 3-7 BoNT/E 切割神经细胞中 SNAP25 的 Western blot 鉴定图 .....	52
图 3-8 研究结果示意图 .....	55
图 4-1 BoNT/E-3K/3A 的突变位点 .....	57
图 4-2 BoNT/E-2C/2A 的突变位点 .....	58

图 4-3 BoNT/E-dM 的突变位点 .....	58
图 4-4 表达载体的双酶切鉴定 ( <i>EcoRI</i> 和 <i>XhoI</i> ) .....	61
图 4-5 目的蛋白纯化后 SDS-PAGE 鉴定图.....	61
图 4-6 突变体分子的胰蛋白切割缺刻鉴定.....	63
图 4-7 各蛋白分子在蛋白水平切割 SNAP25 结果图.....	64
图 4-8 各蛋白分子在蛋白水平切割 SNAP25 结果图.....	65
图 4-9 Activation loop 突变体切割 SH-SY5Y 中 SNAP25 的 Western blot 鉴定结果	66
图 4-10 Activation loop 突变体切割 neuro-2a 中 SNAP25 的 Western blot 鉴定结果	67
图 4-11 研究结果示意图.....	71

## 缩略词

缩写	英文全称	中文全称
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
BoNT	Botulinum neurotoxins	肉毒毒素
BoNT/E	Botulinum neurotoxin serotype E	E 型肉毒毒素
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
EC <sub>50</sub>	concentration for 50% of maximal effect	半数有效浓度
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附测定
H	Heavy chain	重链
Hc	C-terminus of Heavy chain	重链羧基端（结合结构域）
HN	N-terminus of Heavy chain	重链氨基端（跨膜结构域）
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
IgG	Immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
IPTG	Isopropyl thio- $\beta$ -D-galactoside	异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷
Kan	Kanamycin	卡那霉素
L	Light chain	轻链
LD <sub>50</sub>	Median lethal dose	半数致死剂量
neuro-2a	mouse neuroblastoma N2a cells	小鼠脑神经瘤细胞
PBS	phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲液
SNAP25	Synaptosome associated protein 25	突触体相关蛋白 25
SNAREs	Soluble N-ethylmaleimide Sensitive factor Attachment protein receptors	可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感分子附着蛋白受体
SV2	Synaptic vesicle glycoprotein 2	突触囊泡蛋白 2
Tris-HCl	Tris (hydroxymethyl) aminomethane	三（羟甲基）氨基甲烷缓冲液
Trx	Thioredoxin	硫氧还蛋白
VAMP	Vesicle-associated membrane protein	囊泡相关膜蛋白

# 1 引言

## 1.1 肉毒毒素概述

肉毒毒素 (botulinum neurotoxin, BoNT) 是一种由革兰氏阳性菌属的肉毒梭菌 (*Clostridium botulinum*) 在厌氧的情况下产生的神经毒素蛋白, 是已知毒性最强的物质之一<sup>[1, 2]</sup>。根据血清抗原性的不同, 可分为 A-G 七种, 其中 A、B、E 和 F 可导致人类中毒, 近年来新的血清型肉毒毒素被发现, 被命名为 BoNT/H 和 BoNT/X<sup>[3]</sup>。同种血清型肉毒毒素又可分为不同的亚型, 不同亚型的氨基酸序列存在一定差异<sup>[4, 5]</sup>。食物处理不当可引发食源性肉毒毒素中毒, 肠道异常或受损及伤口感染肉毒梭菌也可导致肉毒中毒。肉毒中毒后的临床表现主要为: 吞咽困难、言语不清、腹泻、复视及呼吸困难<sup>[6]</sup>。肉毒毒素虽可引发人类中毒, 但目前其可作为一种药物用于医疗美容以及某些神经疾病的治疗<sup>[7]</sup>。

## 1.2 肉毒毒素的结构和发挥神经毒性的过程

### 1.2.1 肉毒毒素的结构

20 世纪 90 年代, 7 种血清型肉毒毒素的蛋白质序列被解析, 不同血清型间约有 40-70% 的同源性<sup>[8, 9]</sup>。全长肉毒毒素的分子量大小约为 150 kDa, 由分子量约 50 kDa 的轻链 (Light chain, L) 和分子量约 100 kDa 的重链 (Heavy chain, H) 通过一个二硫键连接而成<sup>[10]</sup>, L 链是催化结构域, 具有蛋白酶活性, 而 H 链又可分为跨膜结构域 (HN, 50 kDa) 和结合结构域 (Hc, 50 kDa)。不同血清型肉毒毒素的结构均由催化结构域、跨膜结构域和结合结构域组成, 肉毒毒素结构示意图见图 1-1。

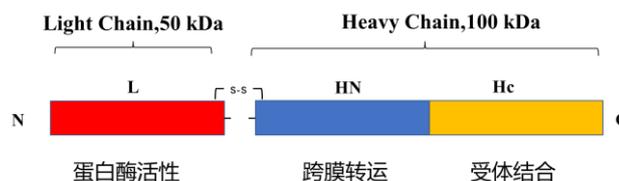


图 1-1 肉毒毒素的结构示意图

Figure 1-1 Schematic diagram of the structure of botulinum neurotoxin

### (1) 结合结构域

Hc 位于重链的羧基端, 1984 年就有研究表明肉毒毒素的 Hc 结构域在与神经细胞的结合过程中起关键作用<sup>[11]</sup>。事实上, 对于肉毒毒素受体的相关研究得益于破伤风毒素<sup>[12]</sup>, 在早期发现神经节苷脂是破伤风的受体, 进而越来越多的数据表明神经节苷脂也可作为 BoNT 的受体, 随着研究的深入, 肉毒毒素的受体可能不只一种<sup>[13]</sup>。1986 年有研究人员提出双受体模型, 指出神经节苷脂是肉毒毒素的第一受体且与肉毒毒素的亲和能力较低, 除此之外细胞上还存在高亲和力受体<sup>[14]</sup>, 目前已经证明 BoNT/A、BoNT/E、BoNT/F 和 BoNT/H 可利用突触囊泡蛋白 (synaptic vesicle glycoprotein 2, SV2) 作为第二受体<sup>[15-17]</sup>, BoNT/B 和 BoNT/G 以突触结合蛋白 II (Synaptotagmin II, Syt II) 为第二受体<sup>[18]</sup>, 并且在 2013 年有研究表明成纤维细胞生长因子受体 3 (fibroblast growth factor receptor 3, FGFR3) 可能是 BoNT/A 的新受体<sup>[19]</sup>。

### (2) 跨膜结构域

HN 位于肉毒毒素 H 链的氨基端, 对于 HN 结构域的功能目前仍不完全清楚, 但其在 BoNT 运输过程中发挥着重要作用<sup>[20]</sup>。研究表明 HN 对 L 在细胞质中的易位起重要作用, HN 的构象可在酸性环境中发生改变, 形成穿过内膜的通道, 协助 L 的跨膜转运<sup>[21]</sup>, 但是也有研究提出 HN 可有效抑制肉毒毒素和 synaptosome 的结合<sup>[22]</sup>, 并且肉毒毒素可在无 Hc 的情况下介导 L 的跨膜转运<sup>[23]</sup>。目前对于肉毒毒素 HN 结构域是如何形成协助 L 跨转运的通道及确切的作用机制仍不完全清楚<sup>[24]</sup>。

### (3) 催化结构域

在肉毒毒素 3 个结构域中, L 链是研究最多的结构域, 它是肉毒毒素发挥神经毒性作用的结构域, 可裂解可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体 (soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor, SNAREs), 不同血清型的肉毒毒素的 L 链可作用于不同的底物分子, 其中 BoNT/A、BoNT/C 和 BoNT/E 可切割细胞内的突触体相关蛋白 25 (synaptosome associated protein, SNAP25)<sup>[25, 26]</sup>, 而 BoNT/B、BoNT/D、BoNT/F、BoNT/G 可切割囊泡相关蛋白 (vesicle associated membrane protein, VAMP)<sup>[27]</sup>。

## 1.2.2 肉毒毒素发挥神经毒性的过程

肉毒毒素的 3 功能结构域的结构对其发挥神经毒性作用至关重要。肉毒毒素进入神经细胞发挥麻痹作用的过程包括: 1: 肉毒毒素进入体内循环系统后, 首先 Hc 结构域识别并结合细胞表面的受体分子, 该过程可以分为两步: 首先和第

一受体神经节苷脂结合形成一种复合体，之后该复合体和高亲和力受体结合<sup>[28]</sup>。2: 肉毒毒素通过内吞进入细胞膜。3: 在酸性环境中，肉毒毒素 HN 会介导 L 链的跨膜易位，且 L 和 H 之间的二硫键对 L 转运到胞浆起着重要作用。但目前关于 HN 介导 L 链跨膜易位的机制仍不完全明确。L 链在被暴露到胞浆中后，细胞质中的 NADPH-硫氧还蛋白还原酶-硫氧还蛋白系统使得 L 和 HN 间的二硫键断裂，进而 L 进入细胞质中<sup>[29, 30]</sup>。4: L 链具有金属蛋白酶活性，其被释放到细胞质后，进而发挥蛋白酶的作用切割底物蛋白 SNAREs，从而抑制乙酰胆碱的释放，产生麻痹，肉毒毒素的作用机制见图 1-2<sup>[31]</sup>。

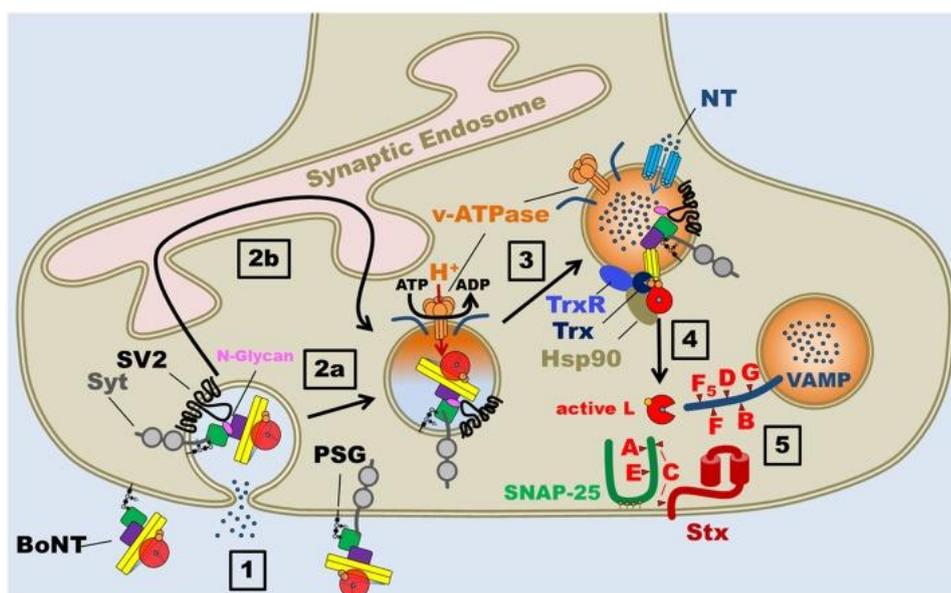


图 1-2 肉毒毒素的作用机制<sup>[31]</sup>

Figure 1-2 Mechanism of action of botulinum neurotoxin<sup>[31]</sup>

### 1.3 肉毒毒素的医学应用

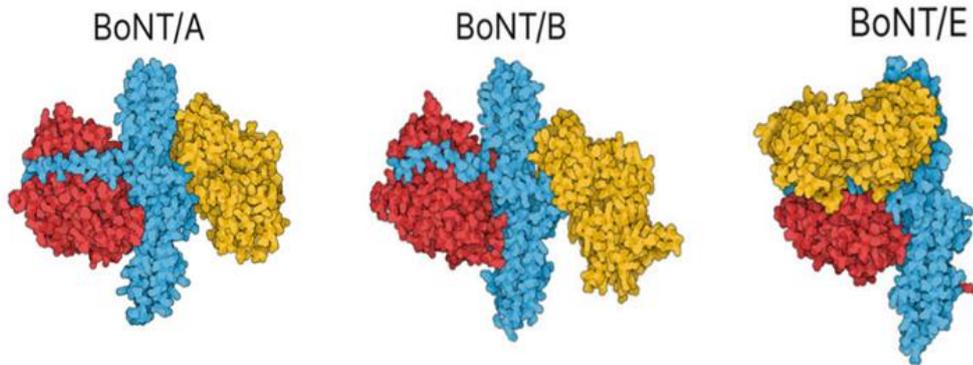
肉毒毒素特异性切割 SNAREs 进而抑制兴奋性神经递质的释放，产生松弛性麻痹。基于肉毒毒素的结构和作用机制，肉毒毒素已被用于某些疾病的治疗。1989 年，肉毒毒素被美国 FDA 批准可用于治疗斜视<sup>[32]</sup>，之后关于肉毒毒素的适应症逐渐增多，尤其是在医疗美容行业和神经医学领域<sup>[33]</sup>。越来越多的研究表明，肉毒毒素对于某些疾病的治疗有着巨大的潜力，如肉毒毒素可用于头痛<sup>[34]</sup>、关节炎<sup>[35]</sup>、泌尿系统<sup>[36]</sup>等疾病的治疗，除此之外还可促进伤口愈合<sup>[37]</sup>。基因工程等技术使得肉毒毒素的治疗潜力逐渐扩大，可以通过对肉毒毒素的改造，使其结合、催化或作用时间得到改变，从而达到可满足不同疾病治疗的效果

[38]。例如：Syt II 是 BoNT/B 的受体蛋白，然而 BoNT/B 对人源的 Syt II 呈现出较低的亲和力，Tao 等对 BoNT/B 序列进行突变以提高对人源 Syt II 的亲和力，突变后的 BoNT/B 与原始分子相比其对阻断神经递质的能力提高了约 11 倍<sup>[39]</sup>；虽然针对肉毒毒素的中和抗体已被研发，但其只能在肉毒毒素进入神经细胞前才能发挥作用，有研究人员构建了一种由 BoNT/A 的 Hc 和 BoNT/X 的无毒力的 L-HN 组成的嵌合分子，并在 L 侧引入了可中和 BoNT/A 的纳米抗体，以期到达可将抗体靶向运输到细胞内的目的<sup>[40]</sup>。

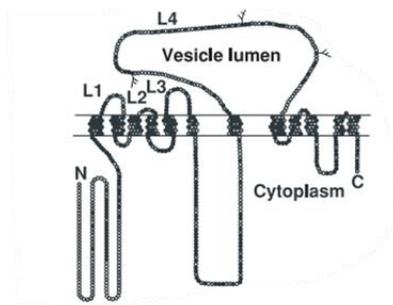
## 1.4 E 型肉毒毒素

根据针对一种血清型产生的抗血清不能中和另一种血清型的毒性作用，可以区分不同血清型肉毒毒素。由于氨基酸序列的差异，每种血清型可以分为不同的亚型，E 型肉毒素共有 12 个亚型（BoNT/E1-BoNT/E12）<sup>[9]</sup>。E 型肉毒毒素的首次发现和 1934 年苏联的一起食用鲟鱼而引发的中毒事件相关，之后 Gunnison 研究团队发现从鲟鱼肠道中分离的肉毒梭菌是一种新的血清型肉毒梭菌，并将其命名为 E 型<sup>[41]</sup>。在国外 BoNT/E 中毒事件常发生于沿海地区，可能与食用受到被肉毒毒素污染的海洋动物或其他食物有关，而我国有关 BoNT/E 中毒的报道主要分布在青藏高原及内陆平原等地，主要是食用发酵后的豆类或冬藏肉导致的<sup>[42]</sup>。目前临床上对 BoNT/E 的防治主要有美军研发的七价马抗毒素（H-BAT）<sup>[43]</sup>，以及我国兰州生物制品研究所研发的抗毒素等。在控制剂量的情况下，肉毒毒素可作为一种治疗药物，目前市面上可用于治疗用途的肉毒毒素主要为 A 型，然而 BoNT/E 的生物特性使其也可作为一种治疗药物，目前在国外已经有 BoNT/E 用于治疗用途的报道。2018 年，Yoelin 等在 E 型肉毒毒素治疗眉间纹的临床研究中发现 BoNT/E 显示出良好的安全性、耐受性和剂量依赖性<sup>[44]</sup>，且重组 E 型肉毒毒素在国外也已完成 I 期临床实验研究，并表现出良好的安全性<sup>[45]</sup>。

肉毒毒素在细菌体内均以单链分子的形式产生，之后在细菌体内或体外酶的作用下裂解形成由轻链和重链通过单个二硫键相连的活性双链结构<sup>[46, 47]</sup>，由于产生 BoNT/E 的肉毒梭菌自身不能产生相应的酶，需与体外酶作用才能形成具有活性的双链结构。BoNT/A、BoNT/B 及 BoNT/E 的晶体结构先后被确定<sup>[48-50]</sup>，如图 1-3<sup>[8]</sup>所示，BoNT/E 的结构与 BoNT/A 和 BoNT/B 相比表现出独特的地方，BoNT/A 和 BoNT/B 中 L 和 Hc 分别位于 HN 结构域的两侧，呈线性排列，而 BoNT/E 的 L 和 Hc 位于 HN 同一侧，其结构更加紧凑，类似球体<sup>[8]</sup>，因此与其它血清型相比 E 型肉毒毒素中毒反应发生的更为迅速<sup>[51]</sup>。

图 1-3 BoNT/A、BoNT/B 和 BoNT/E 的晶体结构<sup>[8]</sup>Figure 1-3 Crystal structure of BoNT/A, BoNT/B and BoNT/E<sup>[8]</sup>

BoNT/E 通过双受体模型结合神经细胞，目前已经证明的受体分别是：低亲和力受体神经节苷脂和高亲和力受体 SV2。虽然神经节苷脂是所有肉毒毒素的共同受体，但不同血清型 BoNT 和神经节苷脂的结合能力存在差异。GM1、GD1a、GD1b 和 GT1b 占哺乳动物神经元神经节苷脂的绝大部分<sup>[52]</sup>，BoNT/E 与 GD1a 和 GT1b 的亲和能力更高<sup>[53]</sup>。SV2 蛋白主要是由 12 个跨膜结构域和一个的管腔结构域（第四个管腔结构域，L4）组成，SV2 蛋白的结构见图 1-4<sup>[54]</sup>。SV2 蛋白有 3 种亚型，分别为 SV2A、SV2B 和 SV2C，其中已经证明 BoNT/A 可以和三种亚型的 SV2 结合，但和 SV2C 的亲合力要强于 SV2A 和 SV2B，而 BoNT/E 可能利用 SV2A 和 SV2B 作为受体，并且 SV2 蛋白和 BoNT/A 和 BoNT/E 的结合主要是 SV2（L4）介导的<sup>[55]</sup>。BoNT/E 与细胞上受体结合后，经内吞作用形成囊泡进入胞内，之后 HN 可介导 L 易位到细胞质，进而 L 特异性切割底物蛋白 SNAP25，进而产生麻痹作用。

图 1-4 SV2 蛋白示意图<sup>[54]</sup>Figure 1-4 Schematic drawing of SV2<sup>[54]</sup>

## 1.5 研究目的及意义

肉毒毒素是一种生物毒素，肉毒中毒事件严重威胁到人类的生命安全，在已知的血清型肉毒毒素中，A、B、E、F 会导致人类中毒。除此之外，由于肉毒毒素的结构和功能特性，在严格控制剂量的情况下其可发挥治疗疾病的效果。目前尽管对肉毒毒素的作用机制已经有较广泛的探索，如对肉毒毒素作用的起始和终点已得到较充分研究，但是对其中的关键步骤的研究仍不够透彻（如：HN 的功能），目前仍有不明确的地方<sup>[56]</sup>。深入研究肉毒毒素的作用机制对肉毒毒素的预防和治疗以及扩大肉毒毒素的临床应用范围有重大意义。然而目前在全球范围内，研究学者对 A 型肉毒毒素的相关机制研究和应用最多，对 E 型肉毒毒素的研究相对较少。与 A 型肉毒毒素相比，E 型肉毒毒素的分子结构紧凑，进入细胞的过程更快<sup>[51]</sup>，中毒症状的产生也更加迅速，并且 E 型肉毒毒素以单链分子形式从细菌中产生时，需要被外源蛋白酶缺刻才能被激活为活性双链分子<sup>[51, 57]</sup>。本研究检测了 EL-HN 分子在体内和体外的活性，以分析 HN 结构域在肉毒毒素发挥作用中的功能；初步分析了 E 型肉毒毒素和 SV2C 的结合作用；检测 E 型肉毒毒素激活环形区突变体分子的活性，以分析单链 E 型肉毒毒素发挥作用可能存在的分子机制。本研究探究了 E 型肉毒毒素作用效应中可能存在的分子机制，可为肉毒毒素相关基础研究提供数据，为肉毒毒素治疗药物的研发提供新思路。

## 1.6 方法和技术路线

本研究的主要方法和技术路线见图 1-5。



图 1-5 技术路线

Figure 1-5 Technical route

## 2 EL-HN 分子的生物学活性和作用研究

肉毒毒素 (BoNT) 是一种由肉毒梭菌产生的神经毒素蛋白, 被认为是一种潜在的生物恐怖制剂<sup>[56, 58]</sup>。肉毒毒素可分为 7 种血清型 (BoNT/A 至 BoNT/G), 每种血清型又可分为不同的亚型<sup>[59, 60]</sup>。近年来又发现了新的血清型肉毒梭菌神经毒素 (如 BoNT/H 和 BoNT/X)<sup>[3, 61]</sup>。虽然肉毒毒素属于强的神经毒素, 能够造成人类中毒, 但肉毒毒素的神经毒性特性使其在医学和医疗美容行业也发挥着非常重要的作用。深入研究肉毒毒素的作用机制对肉毒毒素中毒的治疗及扩大肉毒毒素的应用范围有着重要意义<sup>[62]</sup>。然而, 肉毒毒素发挥神经毒性的机制非常复杂, 肉毒毒素的作用机制目前仍不明确<sup>[63]</sup>。一般认为, BoNT 与神经细胞结合的过程是通过受体结合域 (Hc) 发生的。然而, 有研究发现 BoNT/A 和 BoNT/B 中的 HN 结构域也参与了结合过程<sup>[27, 64]</sup>。目前 BoNT/A 的相关研究较为广泛, 而 BoNT/E 的相关研究相对较少。本课题组前期发现 E 型肉毒毒素的 L-HN 分子 (EL-HN) 保留了酶活性, 具有相应的生物学活性, 在 E 型肉毒毒素所有功能结构域中其免疫效力最强, 具有最高的保护功效<sup>[65]</sup>。因此, 我们以 EL-HN (EL-HN 分子示意图见图 2-1) 为研究对象, 通过体内外实验进一步研究其结构特性和生物学活性。本研究首先利用大肠杆菌表达 EL-HN 分子, 在体外利用胰蛋白酶将其激活成双链分子, 然后对其在蛋白、细胞以及动物体内的活性进行检测。实验结果表明 EL-HN 的毒力在 4 种血清型 (A / B / E / F) 的 L-HN 片段中是最高的, EL-HN 可以切割小鼠脑神经瘤细胞 (neuro-2a) 中的 SNAP25, 推测 EL-HN 进入神经细胞可能是由 HN 结构域与细胞膜表面受体结合或通过其他途径介导的。

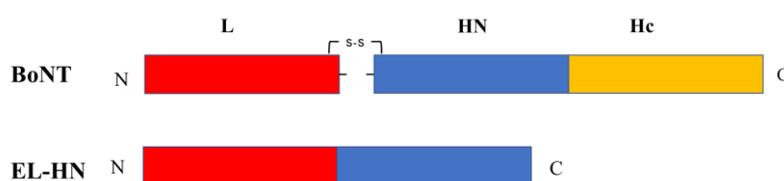


图 2-1 EL-HN 示意图

Figure 2-1 Schematic diagram of EL-HN

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 主要仪器

本章实验所需主要设备仪器见表 2-1。

表 2-1 实验所需的主要仪器

Table 2-1 Main instruments in the experiment

仪器名称	生产厂家
PCR 扩增仪	Bio-Rad
凝胶成像仪	Bio-Rad
核酸电泳仪	Bio-Rad
AKTA purifier 蛋白纯化仪	Bio-Rad
蛋白电泳仪	Bio-Rad
超微量分光光度计	Thermo
离心机 5424R 型/5818R 型	Eppendorf
高压灭菌锅	上海尧勋智能科技有限公司
紫外分光光度计	NanoDrop
恒温摇床	Sartorius
电热恒温培养箱	天津泰斯特仪器有限公司
超声破碎仪	宁波新芝生物科技有限公司
Milli-Q 纯水仪	Millipore 公司
微波炉	松下
制冰机	松下
移液器	Thermo
超净台	北京月坛公司
生物安全柜	Nuaire 公司
倒置显微镜	Nikon 公司
倒置荧光显微镜	Nikon 公司

### 2.1.2 实验试剂

本章实验所需主要的试剂见表 2-2。

表 2-2 实验所需的主要试剂

Table 2-2 Main reagents required for experiments

试剂耗材	生产厂家
Trans 10 感受态细胞	北京全式金生物技术股份有限公司
BL21 (DE3) 感受态细胞	南京诺唯赞生物科技股份有限公司
2×Phanta Max Master	南京诺唯赞生物科技股份有限公司
T4 DNA 连接酶	NEB
限制性内切酶	NEB
无内毒素质粒小提中量试剂盒	天根生化科技(北京)有限公司
通用型 DNA 纯化回收试剂盒	天根生化科技(北京)有限公司
琼脂糖	Biowest
琼脂粉	Oxoid
蛋白胨	Oxoid
酵母提取物	Oxoid
异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG)	MACKLIN
蛋白质分子量 MarKer	Thermo
NaCl	西陇科学股份有限公司
吐温	MACKLIN
咪唑	国药集团化学试剂有限公司
HisTrap™ HP	GE
HiTrap™ Desalting Columns	GE
预制胶	翌圣生物科技股份有限公司
QuickBlue 快速染胶液	北京博奥龙免疫技术有限公司
脱脂奶粉	Coolaber
甲醇	国药集团化学试剂有限公司
SNAP25 抗体	北京索莱宝科技有限公司
SV2C 抗体	Abcame
山羊抗小鼠 IgG/辣根酶标记	北京中杉金桥生物技术有限公司
山羊抗兔 IgG/辣根酶标记	北京中杉金桥生物技术有限公司
GAPDH 抗体	北京中杉金桥生物技术有限公司

表 2-2 (续表)

试剂耗材	生产厂家
Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor 488)	Abcam
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor 594)	Abcam
兔抗马 IgG/辣根酶标记	北京索莱宝科技有限公司
trypsin	NEB
GT1b	Enzo Life sciences
Soybean trypsin inhibitor	Sigma
MEM 培养基	Gibco 公司
Neuro-2a	普诺赛
胎牛血清	Gibco 公司
细胞培养瓶	Thermo 公司
胰酶-EDTA	Gibco 公司
氨苄西林钠/链霉素	中诺药业有限公司
PVDF 膜	Milipore
1-Step <sup>TM</sup> Transfer Buffer 缓冲液	Thermo
ECL 显影液	翌圣生物科技股份有限公司
BoNT/E	实验室前期制备并保存
EHc	实验室前期制备并保存
EHN	实验室前期制备并保存
pTIG-Trx-EL-HN-His-tag 表达载体	实验室前期制备并保存
pET32a-SNAP25-His-tag 表达载体	实验室前期制备并保存
pTIG-Trx-His-tag 表达载体	实验室前期制备并保存

### 2.1.3 溶液配制

#### (1) 2×YT 液体培养基

称 10 g 酵母提取物, 16 g 胰蛋白胨, 5 g NaCl, 置于 2 L 烧杯中, 加入适量去离子水, 利用磁力搅拌器搅拌, 完全溶解后定容至 1 L, 之后进行分装, 121°C 高压灭菌 20 min。

#### (2) 2×YT 固体培养基

称 2 g 酵母提取物, 3.2 g 胰蛋白胨, 3 g NaCl, 3 g 琼脂粉于烧杯中, 加入 200 mL 去离子水, 磁力搅拌器搅拌均匀后, 121°C 高压灭菌 20 min, 恢复至室温后保存备用。

(3) 0.2 M 的磷酸钠缓冲液 (PB, pH 7.4)

配置 100 mL 的 0.2 M PB (pH 7.4) 缓冲液: 取 19.0 mL 的 0.2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  与 81.0 mL 的 0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  混合均匀后备用。

(4) 100 mL 50 mM Tris-Cl 缓冲液 (pH 8.0)

取 50 mL 的 0.1 M Tris 与 26.8 mL 的 0.1 M HCl, 混合后, 加去离子水定容至 100 mL。

(5) PBST 缓冲液

称 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.24 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  于烧杯中, 加适量去离子水, 待组分完全溶解后, 加去离子水定容至 1 L, 加 1 mL 的吐温 20, 混匀后备用。

(6) 2 M 咪唑

称 68 g 咪唑于烧杯中, 加 400 mL 的去离子水, 充分搅拌溶解后, 加去离子水定容至 500 mL。

(7) 2 M NaCl 溶液

称 58.44 g 固体 NaCl 于烧杯中, 加入 400 mL 去离子水, 充分搅拌溶解后, 加去离子水定容至 500 mL。

(8) 1% 琼脂糖凝胶

称取 2 g 琼脂糖加入 200 mL 的 1×TAE 缓冲液和 8  $\mu\text{L}$  的核酸染料, 微波炉加热至琼脂糖完全溶解后, 倒入合适的制胶板中, 凝固后备用。

(9) TBST

将 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 3 g Tris 加去离子水至 1 L, 完全溶解后, 加 1 mL 吐温 20。

(10) 500 mL 的 20 mM PB; 500 mM NaCl; 20 mM 咪唑 (pH 7.4) 缓冲液  
量取 100 mL 的 0.2 M PB 缓冲液, 125 mL 2 M NaCl, 5 mL 2 M 咪唑, HCl 调 pH 至 7.4, 加去离子水定容至 500 mL。

(11) 500 mL 的 20 mM PB; 500 mM NaCl; 500 mM 咪唑 (pH 7.4) 缓冲液

量取 100 mL 的 0.2 M PB 缓冲液, 125 mL 2 M NaCl, 125 mL 2 M 咪唑, HCl 调 pH 至 7.4, 加去离子水定容至 500 mL。

(12) 500 mL 的 20 Tris-Cl; 500 mM NaCl; 20 mM 咪唑 (pH 8.0) 缓冲液  
量取 200 mL 的 0.05 M Tris-Cl 缓冲液, 125 mL 的 2 M NaCl, 5 mL 的 2 M

咪唑，用 HCl 调 pH 至 8.0，加去离子水定容至 500 mL 后备用。

(13) 500 mL 的 20 Tris-Cl; 500 mM NaCl; 500 mM 咪唑 (pH 8.0) 缓冲液  
量取 200 mL 的 0.05 M Tris-Cl 缓冲液，125 mL 的 2 M NaCl，125 mL 的 2 M 咪唑，HCl 调 pH 至 8.0，加去离子水定容至 500 mL。

(14) 10×邻苯二胺

称 450 mg 的邻苯二胺加入到含有 12.9 mL 0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和 12.1 mL 0.1 M 柠檬酸的混合溶液中，待以上组分完全溶解后，分装到 1.5 mL 离心管中，放到 -20°C 备用。

(15) ELISA 显色液

ELISA 显色液的配制见表 2-3。

表 2-3 ELISA 显色液

试剂	质量/体积
10×邻苯二胺	500 $\mu\text{L}$
0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	2.6 mL
0.1 M 柠檬酸	2.4 mL
30% 过氧化氢	15 $\mu\text{L}$

(16) 300 mL 的 2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$

向 200 mL 去离子水中，缓慢滴加 34 mL 浓硫酸并不断搅拌，最后补充去离子水，使得溶液的终体积为 300 mL，待溶液恢复至室温后备用。

#### 2.1.4 实验动物

体重 16-18 g，雌性 KM 小鼠 (SPF 级别) 采购于北京斯贝福生物技术有限公司并饲养于军事医学研究院实验动物中心，动物实验等相关操作均符合实验动物伦理道德规范，并得到了军事医学研究院实验动物委员会的审查和批准 (LACU-DWZX-2021-01-04)。

#### 2.1.5 PCR 引物与基因 DNA 片段的合成

根据 E 型肉毒毒素基因序列设计引物扩增出 EHN<sub>423-699</sub> (831 bp) 以及

EHN<sub>700-840</sub> (423 bp), 在目的片段的两端分别引入酶切位点 *EcoRI*和 *XhoI*, 并连接到 pTIG-Trx-His-tag 载体上, 特异性引物见表 2-4。利用密码子优化软件 JCat 对 SV2C (L4) (378 bp) 序列进行优化, 将稀有密码子替换为优势密码子, 并在 SV2C (L4) 片段的两端分别引入 *EcoRI*和 *XhoI*酶切位点, 由北京六合华大基因科技有限公司进行全基因的合成, 基因片段设计见表 2-5。

表 2-4 引物序列

Table 2-4 Primer sequence

基因名称	引物序列	片段大小
EHN <sub>423-699</sub>	F-pTIG-Trx- <i>EcoRI</i> -EHN <sub>423-699</sub> CATGGAATTCAAATCTATCTGCATCGAAATC	831 bp
	R-pTIG-Trx- <i>XhoI</i> -EHN <sub>423-699</sub> CATGCTCGAGTTTGTGAACTGGGTGTTGAT	
EHN <sub>700-840</sub>	F-pTIG-Trx- <i>EcoRI</i> - EHN <sub>700-840</sub> CATGGAATTCGTAAGAAGACAGATGTACC	423 bp
	R-pTIG-Trx- <i>XhoI</i> - EHN <sub>700-840</sub> CATGCTCGAG GAAGTAAGAGATCAGGATT	

表 2-5 SV2C 基因序列

Table 2-5 Gene sequences

基因名称	序列	片段大小
SV2C (L4)	GAATTCCTCCCGGACGTTATCAAACACCTGCAGT CTGACGAATACGCTCTGCTGACCCGTAACGTTCA GAAAGACAAATACGCTAACTTCTCTATCAACTTC ACCATGGAAAACCAGGTTACACCCGGTATGGAA TACGACAACGGTCGTTTCCTGGGTGTTAAATTCA AATCTGTTACCTTCAAAGACTCTGTTTTCAAATC TTGCACCTTCGACGACGTTACCTCTGTTAACACC TACTTCAAAAACCTGCACCTTCATCGACACCCTGT TCGAAAACACCGACTTCGAACCGTACAAATTCAT CGACTCTGAATTCAGAAGCTGCTCTTTCCTGCAC AACAAAACCGGTTGCCAGATCACCTTCGACGAC GACTACTCTGCTCTCGAG	378 bp

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 表达载体的构建

#### (1) PCR 扩增目的片段

根据 E 型肉毒毒素的基因序列设计引物，以实验室保存的 pTIG-Trx-EL-HN-His 表达载体为模板，扩增出 EHN<sub>423-699</sub> (831 bp) 以及 EHN<sub>700-840</sub> (423 bp) 片段，PCR 体系如见表 2-6。

表 2-6 PCR 扩增体系

Tab.2-6 PCR amplification system

试剂/DNA	质量/体积
模板	30 ng
2×Phanta Max Master Mix	25 μL
正向引物 (10 μM)	1 μL
反向引物 (10 μM)	1 μL
双蒸水	补齐至 50 μL

#### PCR 扩增程序:

94°C	5 min	
94°C	10 s	} 30 个循环
Tm-5°C	15 s	
72°C	40 s	
72°C	10 min	
4°C	forever	

#### (2) 回收 PCR 产物

提前制备 1% 琼脂糖凝胶，将 PCR 产物与 6×loading buffer 混合后，通过 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定目的片段。通过凝胶成像系统拍摄 DNA 电泳结果，在紫外光下切下目的条带后称重，之后按照 DNA 纯化回收试剂盒说明书进行回收。

#### (3) 酶切 PCR 产物和 pTIG-Trx-His-tag 载体

双酶切反应体系见表 2-7，将配置好的酶切体系混合均匀后，置 37°C 反应 1 h。

表 2-7 双酶切反应体系

Table 2-7 Enzyme digestion reaction system、

试剂/DNA	质量/体积
载体/片段	1 $\mu$ g/0.5 $\mu$ g
<i>Eco</i> RI (20000 units/mL)	1 $\mu$ L
<i>Xho</i> I (20000 units/mL)	1 $\mu$ L
10 $\times$ Cutsmart	5 $\mu$ L
双蒸水	补齐至 50 $\mu$ L

## (4) 回收酶切产物

将酶切后的载体与 6 $\times$ loading buffer 混合，经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。凝胶成像系统拍摄 DNA 电泳结果，并在紫外光下切下 pTIG-Trx-His 载体，之后按照 DNA 纯化回收试剂盒进行回收。酶切后的目的片段按照 DNA 纯化回收试剂盒说明书进行液体回收。

## (5) 连接

将回收后的目的片段和载体在室温下连接 2 h。连接体系见表 2-8。目的片段与载体的摩尔浓度之比约为 3~7: 1。

表 2-8 连接反应体系

Table 2-8 Connection reaction system

试剂/DNA	质量/体积
载体	X
T4 DNA 连接酶 (400000 units/mL)	1 $\mu$ L
10 $\times$ 连接缓冲液	1 $\mu$ L
片段	补齐至 10 $\mu$ L

## (6) 转化

取感受态细胞 Trans 10 于冰上解冻 10 min，之后用移液枪将 10  $\mu$ L 连接产物加到 Trans 10 中，轻弹混匀，冰浴 30 min。提前打开 42 $^{\circ}$ C 水浴锅，将感受态细胞置于水浴锅中，热激 60-90 s，迅速将其转移到冰上，冰浴 2-3 min。之后在无菌条件下加入 400  $\mu$ L 空白 2 $\times$ YT 培养基，37 $^{\circ}$ C、150 rpm 培养 45 min。最后将 200  $\mu$ L 菌液涂布到含有 Amp 抗性的 2 $\times$ YT 固体培养基上，37 $^{\circ}$ C 倒置培养过夜。

## (7) 挑克隆、测序

次日挑取阳性克隆于 5 mL 含有 Amp 的 2 $\times$ YT 培养基中，37 $^{\circ}$ C、220 rpm 过

夜培养，按照质粒提取试剂盒的说明进行质粒的提取。之后对抽提的质粒进行双酶切鉴定，并将鉴定的正确的质粒送六合华大公司进行测序，通过 DNAMAN 软件进行序列比对，保存序列完全正确的质粒。

## 2.2.2 目的蛋白的制备及鉴定

### (1) 目的蛋白的诱导表达

将构建好的质粒转到大肠杆菌 BL21 (DE3) 中，次日挑取单克隆于 5 mL 含有 Amp (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 抗性的 2 $\times$ YT 培养基中，37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 rpm 摇床培养约 5 h，之后按照 1% 的接种量，接种于 200 mL 2 $\times$ YT 培养基中。待菌体的 OD 值约为 0.6-0.8 时，加入 IPTG 使其终浓度为 0.2 mmol/L，(同时设置不加 IPTG 为对照组，用于检测目的蛋白的表达情况) 16 $^{\circ}\text{C}$ 、220 rpm 培养过夜。

### (2) 目的蛋白的纯化

将低温诱导后的菌液转移到 50 mL 离心管中，两两配平，4 $^{\circ}\text{C}$ 、8000 rpm/min 离心 30 min，弃上清，收集菌体。根据目的蛋白的最佳纯化缓冲体系，使用相应的结合缓冲液将菌体重悬，之后在冰浴下进行超声破碎。使用超声波细胞粉碎仪进行破碎，破碎 3 s、间歇 3 s，总时长约 30-40 min，超声总时间可根据具体情况灵活调整，菌体破碎后呈澄清透明即可。提前于预冷 4 $^{\circ}\text{C}$  离心机，将破碎好的样品 9000 r/min 离心 15 min，收集上清，用 0.22 或 0.45  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤上清液。

使用 AKTA Purif 100 蛋白纯化系统进行蛋白纯化，开启机器后用去离子水冲洗管道至平衡，将 His Trap<sup>TM</sup> HP (5ml) 蛋白纯化柱安装于蛋白纯化仪上并设置流速为 2 mL/min，继续用去离子水冲洗系统约 3-5 个柱体积。用目的蛋白的结合缓冲液冲洗体系，至柱平衡，之后上样：将过滤好的上清穿过纯化柱，同时接取穿过液用于之后的纯化效果分析。上样结束后，用 3-5 倍柱体积的结合缓冲液冲洗柱子至平衡。最后进行梯度洗脱 (50、100、150、200、250、500 mM 咪唑)，待蛋白洗脱下来后，收集纯化到的蛋白。之后对收集的蛋白进行 SDS-PAGE 鉴定，对纯度高的蛋白进行脱盐。用 Hi Trap<sup>TM</sup> Desalting (5 mL) 柱进行脱盐，将目的蛋白置换到 1 $\times$ PBS (pH 7.4) 缓冲液中，最后对脱盐后的蛋白进行 SDS-PAGE 鉴定。

### (3) 目的蛋白的 SDS-PAGE 鉴定

取适量纯化后的蛋白与 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液混合后，煮沸 5 min，之后用 10% 或 12% 的预制胶进行蛋白电泳。电泳完成后，取出凝胶，放到合适容器中，之后加入适量蛋白快染液，摇床染色 30-120 min，之后用去离子水进行脱色。待脱

色完成后对凝胶进行拍照。

#### (4) 目的蛋白的 Western blot 鉴定

转膜：首先将目的蛋白通过 SDS-PAGE 进行分离。裁剪好 PVDF 膜及滤纸，并用甲醇对 PVDF 膜进行激活。将滤纸、PVDF 膜及凝胶用转膜缓冲液浸泡后，按照下层 3 层滤纸、PVDF 膜、凝胶、上层 3 层滤纸，铺于转膜仪上，尽量除去气泡，1.3 A，25 V，转膜 6 min 30 s。

封闭：用 1×TBST 配制 5% 脱脂奶粉用于封闭。将 PVDF 膜置于封闭液中室温封闭 2 h。

一抗孵育：封闭结束后进行一抗孵育。EL-HN、EHN<sub>423-699</sub>、EHN<sub>700-840</sub> 用 BoNT/E 超免马血清（1：5000）；SNAP25 用 SNAP25 兔多克隆抗体（1：1000）；Trx-SV2C（L4）用 SV2C 兔多克隆抗体（1：1000），4℃过夜孵育。

二抗孵育：用 TBST 洗涤膜 3 次，每次 6 min。之后 EL-HN、EHN<sub>423-699</sub>、EHN<sub>700-840</sub> 用兔抗马 HRP IgG（1:5000），SNAP25 和 Trx-SV2C（L4）用山羊抗兔 HRP IgG（1:5000），室温摇床孵育 45 min。

显影：用 TBST 洗涤膜 3 次，每次 6 min，ECL 化学发光法进行显影。ECL 发光试剂盒中 A 液和 B 液混合后（体积比 1：1），将膜置于凝胶成像仪中，用移液枪将发光液均匀滴于 PVDF 膜中，最后拍照。

### 2.2.3 胰蛋白酶缺刻 EL-HN 制备双链分子

将 EL-HN 蛋白与胰蛋白酶（trypsin）按照 100：1 的比例混合后，37℃水浴 45-60 min。待水浴完成后加入 80 μg/mL 的大豆酶抑制剂（Soybean trypsin inhibitor）使其终浓度为 4 μg/mL 以终止反应，最后通过 SDS-PAGE 进行鉴定。

同时制备双链 A / B / F 的 L-HN 分子（AL-HN、BL-HN 及 FL-HN）作为对照，AL-HN、BL-HN 及 FL-HN 由本实验室前期制备并保存，按照与 AL-HN：胰蛋白酶为 100：1，BL-HN：胰蛋白酶为 25：1，FL-HN：胰蛋白酶为 25：1 的质量比进行缺刻实验以制备双链 AL-HN、BL-HN 及 FL-HN 分子。

### 2.2.4 蛋白水平测定 EL-HN 的蛋白酶活性

将不同浓度（0.2 nM-200 nM）的 EL-HN 等相关蛋白与 2 μM 的 SNAP25 蛋白在反应缓冲液（50 mM Hepes，pH 7.5，5 mM DTT，10 mM NaCl 和 0.1% 吐温 20）中反应，使得反应体系的终体积为 50 μL。37℃水浴 30 min，最后将反应体系与 5×蛋白上样缓冲液混合后煮沸 5 min，进行 SDS-PAGE 电泳，以终止反

应。通过各蛋白对 SNAP25 蛋白的切割程度来评价其蛋白水平的活性。

### 2.2.5 EL-HN 等蛋白切割 SNAP25 的 C 端测序

将 EL-HN 等蛋白与 SNAP25 反应后的样品进行蛋白电泳，待凝胶染色、脱色完成后，裁剪割胶条，切取被切割的 SNAP25 蛋白条带，送百泰派克公司进行蛋白质 C 端序列分析。

### 2.2.6 细胞水平检测 EL-HN 的活性

将 neuro-2a 细胞在含有 10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素的 MEM 培养基中进行培养。neuro-2a 在 37°C，含有 5% CO<sub>2</sub> 的环境下生长，待细胞生长到约 80% 融合时，将细胞稀释到约  $5 \times 10^4$  cells/mL，并接种于 24 孔的细胞培养板中，每孔 1 mL。继续培养 24-48 h 至细胞生长约 80% 融合时，将不同浓度的重组蛋白分子，加入到培养基中，37°C，5% CO<sub>2</sub> 培养 12 h。

去除培养基，PBS 洗涤细胞 3 次，加入 70  $\mu$ L 的 1 $\times$ LDS lysis buffer 裂解细胞，冰上裂解 10 min，涡旋振荡 10 s，持续 4 次。提前预冷离心机，4°C，12000 g 离心 15 min，取上清。BCA 法进行蛋白定量，根据 BCA 蛋白定量试剂盒说明书操作。

通过 Western blot 检测 SNAP25 的切割情况：

转膜：首先进行 SDS-PAGE 电泳，在通过 12%SDS-PAGE 分离后，使用转膜仪将细胞裂解液转移到 PVDF 膜上。

封闭：用 5%脱脂奶粉将膜室温封闭 2 h。

一抗孵育：将膜分别与 SNAP25 兔多克隆抗体（1:1000 稀释）和 GAPDH 小鼠单克隆抗体（1:1000 稀释）混合，4°C 孵育过夜。

二抗孵育：用 TBST 洗膜 3 次，每次 6 min。将膜与 1: 5000 稀释的山羊抗兔 IgG HRP，1: 5000 稀释的山羊抗小鼠 IgG HRP 在 37°C 孵育 45 min。

显影：用 TBST 洗涤膜 3 次，每次 6 min。ECL 化学发光法进行显影。将 PVDF 膜置于凝胶成像仪中，ECL 发光试剂盒中 A 液和 B 液 1: 1 混合，用移液枪将发光液均匀滴于 PVDF 膜中，最后拍照。

数据分析：使用 image J 软件进行光密度分析。

### 2.2.7 小鼠体内的半数致死量 (LD<sub>50</sub>) 的测定

采用 LD<sub>50</sub> 测定法测定 EL-HN 及其它 3 种 L-HN 分子在小鼠体内的活性。用无菌生理盐水分别对各蛋白进行稀释，每种剂量 4 只小鼠。采用腹腔注射的方式，每只小鼠注射 500 μL。之后每天记录小鼠的存活数量，连续观察四天，在四天内使 50% 小鼠死亡的最低毒素剂量即为半数致死量 (LD<sub>50</sub>)。

### 2.2.8 ELISA 法检测 EL-HN 分子与 SV2C (L4) 的结合

包被：利用碳酸盐包被液将 Trx-SV2C (L4) 蛋白稀释成 10 μg/mL、2 μg/mL、0.4 μg/mL、0.08 μg/mL、0 μg/mL，之后将稀释后的 Trx-SV2C (L4) 蛋白包被到酶标板上，每孔 100 μL，4°C 包被过夜，PBST 洗涤 6 次。

封闭：在 37°C，用 0.25% 酪蛋白封闭 2 h。

蛋白孵育：PBST 洗涤 6 次，分别将 30 μg/mL 的 EHN<sub>423-699</sub>，EHN<sub>700-840</sub>，EHc 及 BSA 等蛋白加到酶标板中，每孔 100 μL，37°C 孵育 1 h。

一抗孵育：PBST 洗涤 6 次，用 100 μL 1:2000 稀释的抗 EL-HN 鼠血清抗体或抗 EHc 鼠血清抗体在 37°C 下培养 1.5 h。

二抗孵育：PBST 洗涤 6 次，并用山羊抗小鼠 HRP IgG 抗体培养 45 min。

显色：PBST 洗涤 6 次，之后每孔加入 50 μL 的显色液体，室温避光孵育 5-10 min，之后每孔加入 50 μL 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止显色。

读数：利用酶标仪在 492 nm 处检测吸光值。

### 2.2.9 细胞免疫荧光分析 EL-HN 与 neuro-2a 细胞的结合

将 neuro-2a 细胞按  $5 \times 10^4$  cells/mL 的密度接种于细胞培养载玻片，每孔 300 μL，37°C，5% CO<sub>2</sub> 培养 48 h。之后在培养基中加入 100 μM 的 EL-HN，EL 等蛋白，继续培养 2 小时。培养结束后，用 PBS 洗涤细胞 3 次，并在室温下用 4% 多聚甲醛固定 30 min。用 0.1% Triton X-100 在 PBS 中渗透细胞 10 min，然后用山羊血清 37°C 封闭 2 h。将细胞与 1/200 稀释的抗 EL-HN 鼠血清抗体，4°C 孵育过夜。PBST 洗涤细胞 3 次，然后在室温下用 1:500 稀释的 Alexa Fluor 488 山羊抗小鼠 IgG 染色 1 h。PBST 洗涤细胞 3 次。向载玻片中滴加 DAPI 盖上盖玻片，染色 5 min。用 PBS 洗涤细胞 3 次后，用倒置荧光显微镜观察。

EL-HN 蛋白与 SV2C 共定位实验和上述实验步骤相似，其中检测 SV2C 信号用的是 SV2C 兔多克隆抗体 (1:1000)。

### 2.2.10 细胞学阻断实验

在细胞培养基中加入 100 倍过量的 EHN 共同培养 4 h，之后加入 EL-HN 分子，继续培养 12 h。而 SV2C (L4) 则需要提前与 EL-HN 分子混合后在 37°C 水浴 30 min，之后再和 neuro-2a 共同培养。最后去除培养基，PBS 洗涤 3 次，裂解细胞，取裂解液上清进行 Western blot 分析。

### 2.2.11 统计学分析

使用 Graphpad prism 8.0 软件进行数据分析，实验结果用均值 (mean)  $\pm$  标准差 (SD) 来表示，通过 t 检验来分析数据差异，以  $P < 0.05$  表示具有统计学差异。

## 2.3 结果

### 2.3.1 重组质粒表达载体的构建

通过设计特异性扩增引物，以实验室前期保存的 pTIG-Trx-EHN-His-tag 质粒为模板，PCR 扩增出 EHN<sub>423-699</sub> (831 bp) 以及 EHN<sub>700-840</sub> (423 bp)，PCR 扩增产物见图 2-2a-b。将扩增出的 EHN<sub>423-699</sub> 及 EHN<sub>700-840</sub> 片段和 pTIG-Trx-His-tag 载体，用限制性内切酶 *EcoRI* 和 *XhoI* 进行酶切，回收目的片段和载体，最后将回收的片段和载体置于室温连接 1-2 h。将连接产物转化到感受态细胞 Trans10 中，次日挑取单克隆，提质粒并通过 *EcoRI* 和 *XhoI* 进行酶切鉴定，酶切鉴定结果见图 2-2c-d，并将质粒送六合华大公司进行基因序列分析 (测序引物为：TGCTAGTTATTGCTCAGCGG)，通过 DNAMAN 软件进行比对分析，测序结果和目的片段序列完全一致。成功构建 pTIG-Trx-EHN<sub>423-699</sub>-His-tag、pTIG-Trx-EHN<sub>700-840</sub>-His-tag 重组表达载体。

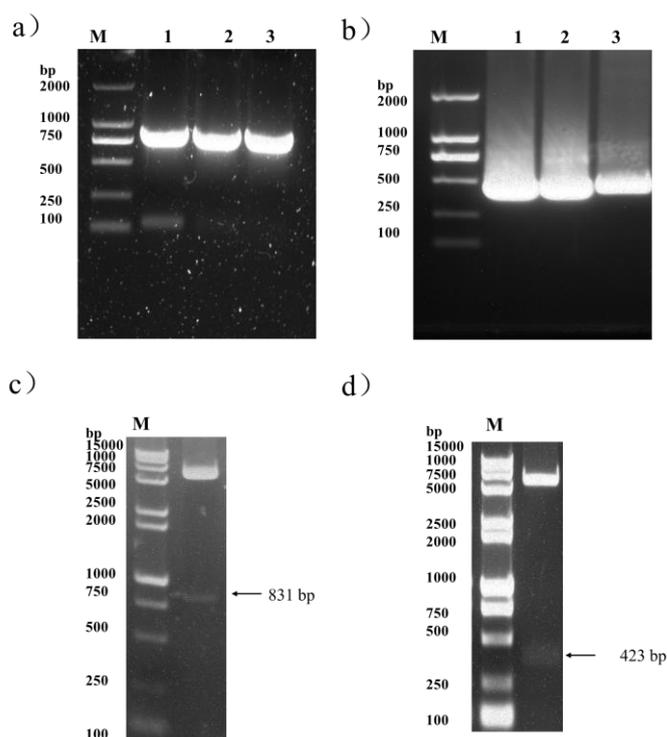


图 2-2 重组表达载体的鉴定

a) EHN<sub>423-699</sub> PCR 扩增图; b) EHN<sub>700-840</sub> PCR 扩增图; c) pTIG-Trx-EHN<sub>423-699</sub> 载体的双酶切鉴定 (*EcoRI* 和 *XhoI*); d) pTIG-Trx-EHN<sub>700-840</sub> 载体的双酶切 (*EcoRI* 和 *XhoI*)  
 注: 图 a) 中 1-3 为 EHN<sub>423-699</sub> PCR 扩增后的产物; 图 b) 中 1-3 为 EHN<sub>700-840</sub> PCR 扩增后的产物

Figure 2-2 Identification of expression vectors

a) PCR amplification of EHN<sub>423-699</sub>; b) PCR amplification of EHN<sub>700-840</sub>; c) Double digestion identification of pTIG-Trx-EHN<sub>423-699</sub> vectors (*EcoRI* and *XhoI*); d) Double digestion identification of pTIG-Trx-EHN<sub>700-840</sub> vectors (*EcoRI* and *XhoI*)

Note: Lanes 1-3 in Figure a) were the products of EHN<sub>423-699</sub> PCR amplification; Lanes 1-3 in Figure b) were the products of EHN<sub>700-840</sub> PCR amplification

利用密码子优化软件 JCat 对 SV2C (L4) 序列进行优化, 并在 SV2C (L4) 片段的两端分别引入酶切位点 *EcoRI* 和 *XhoI*, 由北京六合华大基因科技有限公司进行全基因的合成, 经酶切、连接、转化, 选取阳性克隆进行提质粒, 通过 *EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切鉴定并送公司进行测序 (测序引物为: TGCTAGTT ATTGCTCAGCGG), *EcoRI* 和 *XhoI* 酶切鉴定结果见图 2-3, 通过 DNAMAN 进行序列比对分析, 测序结果和目的片段序列一致, 成功构建 pTIG-Trx-SV2C (L4) -His-tag 表达载体。

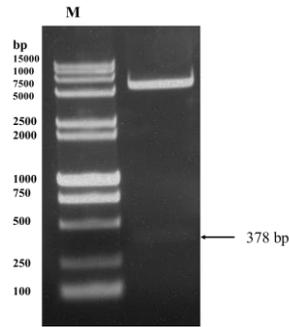


图 2-3 pTIG-Trx-SV2C (L4) -His 的双酶切鉴定 (*EcoRI*和 *XhoI*)

Figure 2-3 Double digestion identification of pTIG-Trx-SV2C(L4)-His (*EcoRI* and *XhoI*)

### 2.3.2 各目的蛋白的表达纯化及鉴定

#### (1) pTIG-Trx-EL-HN-His 的表达与纯化

EL-HN 蛋白由 BoNT/E 的催化结构域和跨膜结构域组成，其蛋白分子量约为 100 kDa。pTIG-Trx-EL-HN-His 质粒由本实验室前期制备并保存，采用 Ni-NTA 镍亲和层析法进行蛋白的纯化。经大肠杆菌 BL21 (DE3) 转化后，加入 0.2 mM 的 IPTG，16°C，220 r 过夜培养以诱导目的蛋白的表达。离心后，用结合缓冲液 (20 mM PB，500 mM NaCl，20 mM 咪唑 (pH 7.4)) 将菌体进行重悬，用洗脱缓冲液 (20 mM PB，500 mM NaCl，500 mM 咪唑 (pH 7.4)) 进行梯度洗脱，最终用 100 mM 的咪唑洗脱出 EL-HN 蛋白。脱盐后用蛋白进行 SDS-PAGE 鉴定，鉴定结果见图 2-4，通过比较泳道 1 和 2 可发现 EL-HN 的表达量较高，最终得到的蛋白浓度最高可达 1 mg/mL，通过泳道 5 可以看出得到的 EL-HN 的纯度较高。

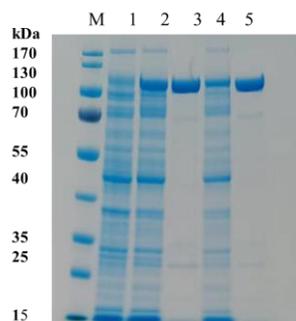


图 2-4 EL-HN 表达与纯化后的重组蛋白 SDS-PAGE 鉴定

注：M：蛋白 Marker；1：未诱导菌上清；2：诱导菌上清；3：100 mmol/L 咪唑洗脱蛋白；4：穿过液；5：脱盐后蛋白

Figure 2-4 SDS-PAGE identification of purified EL-HN fragment

Note: M: protein Marker; 1: Crushed supernatant without induced expression; 2: pTIG-Trx-EL-HN-His induced expression supernatant; 3: Eluted protein at 100 mmol/L imidazole concentration; 4: The remaining liquid passing through the column; 5: Desalted protein

## (2) pET32a-SNAP25-His 的表达纯化

编码人的 SNAP25 蛋白的重组质粒 pET32a-SNAP25-His 由本研究团队前期制备并保存, 将其转到大肠杆菌 BL21 (DE3) 后, 通过 Ni-NTA 镍亲和层析法进行蛋白纯化。大肠杆菌在含有 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 Kana 抗性的 2 $\times$ YT 培养基中培养, 经 0.25 mM 的 IPTG, 16 $^{\circ}\text{C}$ , 220 r 过夜诱导后, 将菌体离心, 用结合缓冲液 (20 mM  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , 500 mM NaCl (pH 7.4)) 将菌体进行重悬, 用洗脱缓冲液 (20 mM  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , 500 mM NaCl, 500 mM 咪唑 (pH 7.4)) 进行梯度洗脱, 最终用 500 mM 的咪唑洗脱出 SNAP25 蛋白。脱盐后, 对蛋白进行 SDS-PAGE 鉴定, 蛋白电泳结果见图 2-5a, 由蛋白电泳结果可以看出, 纯化出了较高纯度的 SNAP25 蛋白且蛋白终浓度最高可达 1.0 mg/mL。之后为进一步验证纯化的 SNAP25 蛋白的正确性和纯度, 以 SNAP25 兔多克隆抗体为抗体进行了 Western blot 验证, 检测结果见图 2-5b, 通过 Western blot 结果可以看出本实验表达出的蛋白为 SNAP25 蛋白。

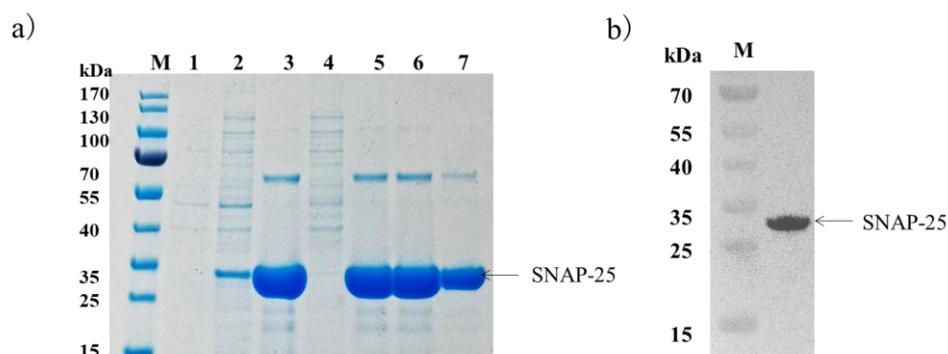


图 2-5 SNAP25 表达与纯化后的 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定

a) SNAP25 的 SDS-PAGE 鉴定图; b) SNAP25 的 Western blot 鉴定图

注: M: 蛋白 Marker; 1: 未诱导菌上清; 2: 诱导菌上清; 3: 100 mmol/L 咪唑洗脱蛋白;  
4: 穿过液; 5-7: 脱盐后蛋白

Figure 2-5 SNAP25 expression and purification of SDS-PAGE and Western blot identification

a) SDS-PAGE identification of SNAP25; b) Western blot identification of SNAP25

Note: M: protein Marker; 1: Uninduced bacterial supernatant; 2: Induce bacterial supernatant; 3: 100 mmol/L imidazole-eluting protein; 4: Through the liquid; 5-7: Desalted proteins

(3) pTIG-Trx-SV2 (L4) -His 的表达纯化

本实验所要表达的编码鼠源 SV2C (L4) 蛋白是和 Trx 融合表达的分子, 融合分子的分子量大小约为 30 kDa。大肠杆菌经 0.2 mM 的 IPTG, 16°C, 220 r 过夜诱导表达后, 用结合缓冲液 (20 mM Tris-Cl, 500 mM NaCl, 20 mM 咪唑 (pH 8.0)) 将菌体进行重悬, 用洗脱缓冲液 (20 mM Tris-Cl, 500 mM NaCl, 500 mM 咪唑 (pH 8.0)) 进行目的蛋白的洗脱, 纯化结果见图 2-6a, 250 mM 和 500 mM 的咪唑洗脱时均有目的蛋白的流出。在以 PBS (pH 7.4) 缓冲液进行蛋白脱盐, 放-20°C 保存后, 发现有大量蛋白析出, 之后换 20 mM Tris-Cl+100 mM NaCl 为缓冲液进行脱盐, 并且加入蛋白酶抑制剂后将蛋白分装, 放-80°C 冰箱进行保存。进一步以 SV2C 兔多克隆抗体为一抗进行 Western blot 鉴定, 以鉴定 SV2C (L4) 蛋白的正确性和纯度, Western blot 结果见图 2-6b。通过镍柱亲和层析法纯化出了高纯度的 Trx-SV2C (L4) 蛋白。

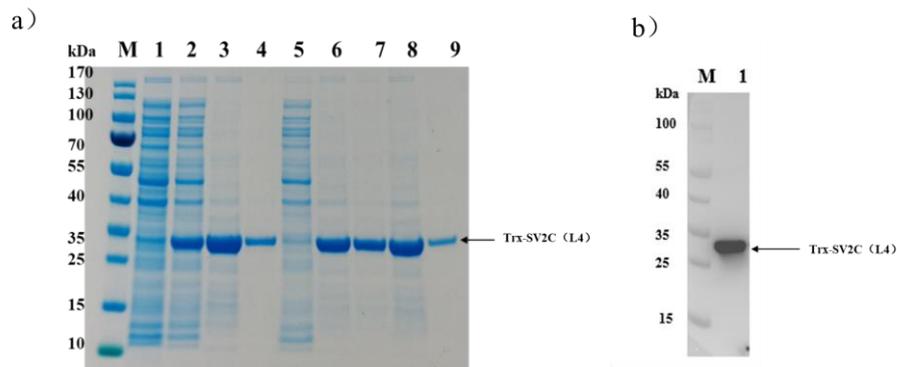


图 2-6 Trx-SV2C (L4) 纯化后 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定

a) Trx-SV2C (L4) 的 SDS-PAGE 鉴定图; b) Trx-SV2C (L4) 的 Westert blot 鉴定图

注: M: 蛋白 Marker; 1: 未诱导菌上清; 2: 诱导菌上清; 3: 250 mmol/L 咪唑洗脱蛋白;

4: 500 mmol/L 咪唑洗脱蛋白 5: 穿过液; 6-9: 脱盐后蛋白

Figure 2-6 SDS-PAGE and Western blot identification of purified Trx-SV2C(L4)

a) SDS-PAGE identification of Trx-SV2C(L4); b) Western blot identification of Trx-SV2C(L4)

Note: M: protein Marker; 1: Crushed supernatant without induced expression; 2: pTIG-Trx-SV2C(L4)-His induced expression supernatant; 3: Eluted protein at 250 mmol/L imidazole concentration; 4: Eluted protein at 500 mmol/L imidazole concentration; 5: The remaining liquid passing through the column; 6-9: Desalted protein

(4) pTIG-Trx-EHN<sub>423-699</sub>-His 和 pTIG-Trx-EHN<sub>700-840</sub>-His 的表达纯化

EHN<sub>423-699</sub> 和 EHN<sub>700-840</sub> 分别为编码 BoNT/E 的 423-699 氨基酸和 700-840 个

氨基酸，位于跨膜结构域。本实验所表达的 EHN<sub>423-699</sub> 和 EHN<sub>700-840</sub> 是和 Trx 融合蛋白，融合分子的相对分子质量分别约为 46 kDa 和 31 kDa。转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 后，经 0.2 mM 的 IPTG，16°C，220 r 过夜诱导表达后，用结合缓冲液 20 mM Tris-Cl + 500 mM NaCl+20 mM 咪唑 (pH 8.0) 将菌体进行重悬，洗脱缓冲液 20 mM Tris-Cl + 500 mM NaCl+500 mM 咪唑 (pH 8.0) 进行目的蛋白的洗脱，最终获得 EHN<sub>423-699</sub> 和 EHN<sub>700-840</sub>。之后通过蛋白电泳和 Western blot 进一步验证目的蛋白抗原的正确性和纯度，实验结果见图 2-7，在 Western blot 实验中以本实验室前期保存的超免 EL-HN 小鼠血清为一抗进行检测。通过对纯化后的 EHN<sub>423-699</sub> 和 EHN<sub>700-840</sub> 进行鉴定，本实验制备出的两种目的蛋白的浓度和纯度能够满足后续实验需求。

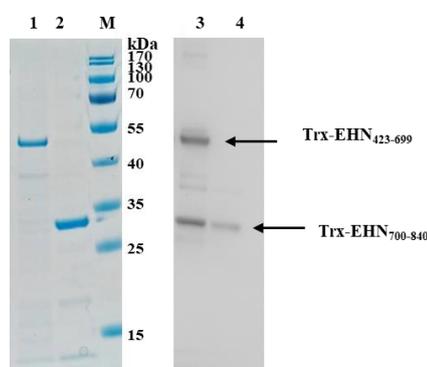


图 2-7 Trx-EHN<sub>423-699</sub> 和 Trx-EHN<sub>700-840</sub> 的 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定

注：1 号和 3 号泳道为 Trx-EHN<sub>423-699</sub>，2 号和 4 号为 Trx-EHN<sub>700-840</sub>

Figure 2-7 SDS-PAGE and Western blot identification of Trx-EHN<sub>423-699</sub> and Trx-EHN<sub>700-840</sub>

Note: lane 1 and 3 are Trx-EHN<sub>423-699</sub>, lane 2 and 4 are Trx-EHN<sub>700-840</sub>

### 2.3.3 双链 EL-HN 的制备

经大肠杆菌表达后的 EL-HN 蛋白，其 L 和 HN 之间无二硫键连接，是单链 EL-HN (single chain EL-HN, EL-HN-SC)。胰蛋白酶可作为一种肽链内切酶，切断赖氨酸和精氨酸残基中的羧基，使得 L 和 HN 之间通过二硫键相连，形成双链 EL-HN (di-chain EL-HN, EL-HN-DC)。目的蛋白与胰蛋白酶反应后通过蛋白电泳进行鉴定。蛋白中的二硫键在通过变性还原条件电泳时，在还原剂的作用下二硫键会发生断裂，使得原本为 100 kDa 的长肽链变为两条分子量为 50 kDa 的肽链，而在非还原电泳下，仍为 100 kDa 的分子，其中双链 EL-HN 分子的制备与鉴定结果见图 2-8，从泳道 1 和 2 可以看出，EL-HN 蛋白和胰蛋白酶按照

100: 1 的质量比, 在 37°C 反应 1 h 后, 可以使得 EL-HN 分子中的 L 和 HN 完全断开, 对比泳道 2 和 4 可以看出, 在非还原条件下绝大部分 L 和 HN 仍然是通过二硫键相连接。从以上结果可以看出, 本实验成功制备出双链 EL-HN 分子。

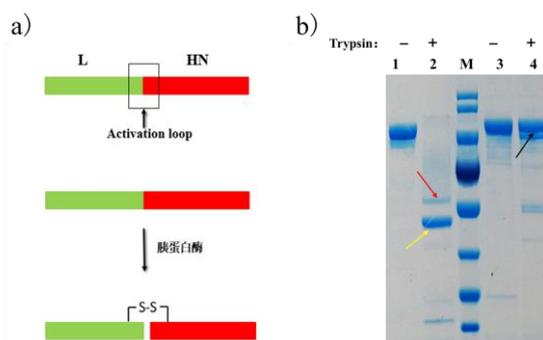


图 2-8 双链 EL-HN 分子的制备

a) EL-HN 双链制备过程示意图; b) 胰蛋白酶切割鉴定图

注: 1 和 2 号泳道分别为还原电泳下的 EL-HN-SC 和 EL-HN-DC, 3 和 4 号泳道分别为还原电泳下的 EL-HN-SC 和 EL-HN-DC; 红色箭头所指的是 EHN, 黄色箭头指的是 EL, 黑色箭头指的是非还原电泳下的 EL-HN 分子

Figure 2-8 Preparation of dichain EL-HN fragment

a) Schematic diagram of di-chain EL-HN preparation process; b) Trypsin cleavage identification

Note: lanes 1 and 2 are EL-HN-SC and EL-HN-DC under reduction electrophoresis, and lanes 3 and 4 are EL-HN-SC and EL-HN-DC under reduction electrophoresis, respectively. The red arrow refers to EHN, the yellow arrow refers to EL, and the black arrow refers to the EL-HN molecule under non-reduction electrophoresis

### 2.3.4 EL-HN 分子在蛋白水平的活性

为研究 EL-HN 分子在蛋白水平的活性, 通过分析目的分子在体外切割 E 型肉毒毒素的底物蛋白 SNAP25 的效率来评价其活性。前期在制备好 SNAP25 底物蛋白后, 将 EL-HN 分子和 SNAP25 共孵育后, 可使得 SNAP25 蛋白发生裂解。为分析单链 EL-HN 和双链 EL-HN 在体外活性的差异, 本实验将单链、双链 EL-HN 两个分子都进行了切割 SNAP25 实验, 同时以 EL 作为对照。通过蛋白电泳来展示各蛋白切割 SNAP25 的结果, 蛋白电泳见图 2-9, 进一步计算出各蛋白切割 2  $\mu$ M 的 SNAP25 蛋白的半数有效浓度 (concentration for 50% of maximal

effect,  $EC_{50}$ ), EL-HN-SC 的  $EC_{50}$  为 5.61 nM, EL-HN-DC 的  $EC_{50}$  为 4.36 nM 以及 EL 的  $EC_{50}$  为 0.18 nM。本实验结果表明, 在体外 EL-HN-DC 及 EL-HN-SC 这两个分子具有和 EL 相似的蛋白酶活性, 都能切割 SNAP25 蛋白, 并且有剂量依赖效应, 而且 EL-HN-DC 切割的 SNAP25 的效率比单链分子要高, 单链分子的切割效率约为双链分子的 77%。

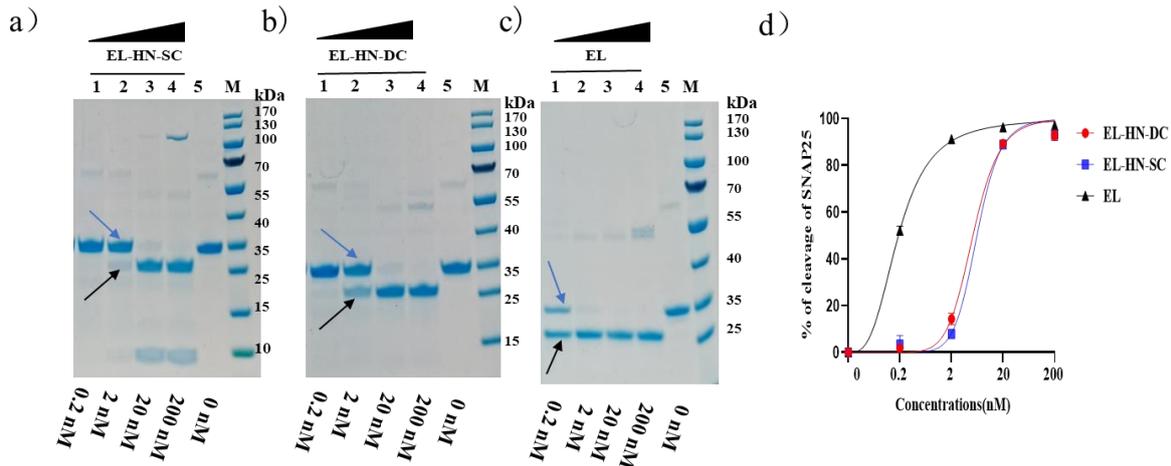


图 2-9 蛋白水平蛋白酶活性实验

a) EL-HN-SC 切割 SNAP25 结果; b) EL-HN-DC 切割 SNAP25 结果; c) EL 切割 SNAP25 结果; d) EL, EL-HN-SC 及 EL-HN-DC 在体外切割 SNAP25 的效率分析

注: SNAP25 的浓度为 2  $\mu$ M, 实验的总体积为 50  $\mu$ L; 蓝色箭头指的是未切割的 SNAP25, 黑色箭头指的是已切割的 SNAP25; EL 作为阳性对照。

Figure 2-9 Protease activity assay at the protein level

a) SNAP25 cleavage by EL-HN-SC; b) SNAP25 cleavage by EL-HN-DC; c) EL cut SNAP25 results; d) analysis of SNAP25 cleavage efficiency by EL, EL-HN-SC and EL-HN-DC in vitro

Note: The concentration of SNAP25 was 2  $\mu$ M, and the total volume of the experiment was 50  $\mu$ L.

Blue arrows refer to uncut SNAP25 and black arrows to cut SNAP25. EL is a positive control.

### 2.3.5 EL-HN 等蛋白切割 SNAP25 位点的 C 端测序

E 型肉毒毒素和 A 型肉毒毒素的 L 都可以切割底物蛋白 SNAP25, 但两者的切割位点不同, 其中 BoNT/E 切割 SNAP25 的位点为 R180-I181, BoNT/A 切割 SNAP25 的位点为 Q197-R198<sup>[66]</sup>, SNAP25 的 C 端序列及 BoNT/E 和 BoNT/A 的切割位点见图 2-10a。为检测本实验室制备的 EL-HN 分子切割 SNAP25 的特异性



e)

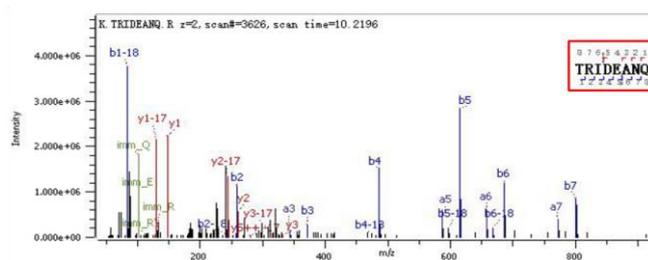


图 2-10 各分子切割 SNAP25 的 C 端测序结果

a) SNAP25 的 C 端序列; b) EL; c) EL-HN; d) BoNT/E; e) AL-HN

注: 图中红色方框中显示的是被切割的 SNAP25 的 C 端序列。

Figure 2-10 C-terminal sequencing results of SNAP25 for each molecule

a) the C-terminal sequence of SNAP25; b) EL; c) EL-HN; d) BoNT/E; e) AL-HN;

Note: The red box in the figure shows the C-terminal sequence of the cleaved SNAP25.

### 2.3.6 EL-HN 分子在细胞水平的活性

为进一步研究 EL-HN 分子在细胞水平的活性, 我们选择 neuro-2a 细胞为模型进行相关实验。待 24 孔板中培养的 neuro-2a 细胞生长到 70-80% 融合时, 将不同浓度的 EL-HN 蛋白 (300 nM; 60 nM; 12 nM) 过滤后, 加到培养基中, 使得目的蛋白和细胞共孵育 12 h, 之后去除含有蛋白的培养基, 并洗涤细胞。最后通过 Western blot 检测细胞裂解物中 SNAP25 被切割的情况来研究 EL-HN 分子在细胞水平的活性。实验中将实验室前期保存的 BoNT/E 和 EL 分别设置为阳性对照和为阴性对照, Western blot 实验中以 GAPDH 为内参, Western blot 结果见图 2-11。图中蓝色箭头代表未被切割的 SNAP25, 黑色箭头已被切割的 SNAP25, 实验结果表明 EL-HN 分子具有和全长 E 型肉毒毒素分子 (BoNT/E) 一样的特性, 能够进入 neuro-2a 细胞切割细胞内的 SNAP25, 并且切割 SNAP25 的效率显示出剂量依赖效应。实验中对单链和双链 EL-HN 分子的切割效率进行了比较, EL-HN-DC 切割 SNAP25 的  $EC_{50}$  约为 151 nM, EL-HN-SC 切割 SNAP25 的  $EC_{50}$  约为 476 nM, 激活后的双链分子切割效率高于单链分子。本实验以 BoNT/E 为阳性对照, 以单独轻链 EL 为阴性对照, BoNT/E 能够进入细胞切割 SNAP25, 缺失 HN 和 Hc 结构域的 EL 没有显示出蛋白酶活性, 但在 HN 结构域存在的情况下 EL-HN 分子可以切割细胞 SNAP25, 表明 HN 结构域上可能存在某些表位可以和神经细胞表面的受体结合。

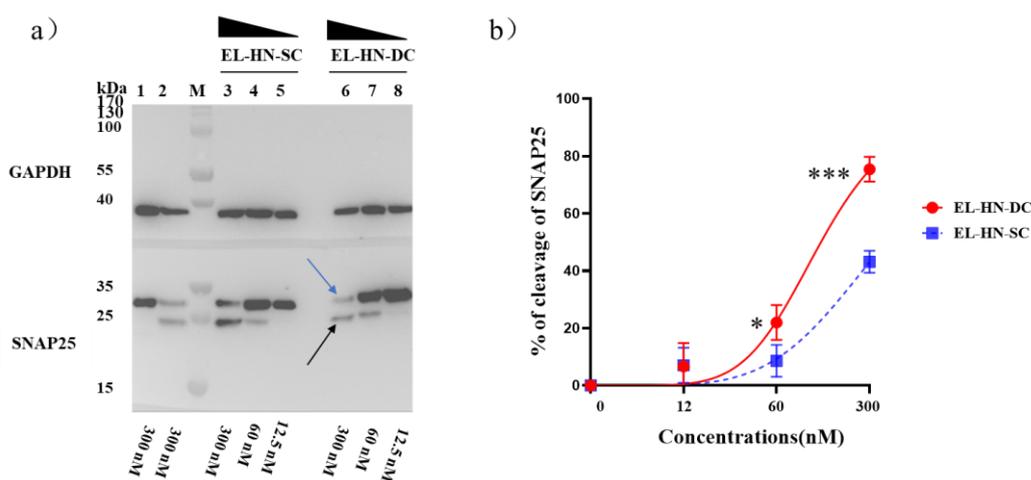


图 2-11 EL-HN 切割 neuro-2a 中的 SNAP25 鉴定结果

a) Western blot 检测不同分子切割 neuro-2a 中的 SNAP25; b) 各分子切割细胞中 SNAP25 的定量分析

注: 1 号泳道为 300 nM 的 EL, 作为本实验的阴性对照; 2 号泳道为 300 nM 的 BoNT/E, 作为本实验的阳性对照; 蓝色箭头指的是未切割的 SNAP25 蛋白, 黑色箭头指的是已切割的 SNAP25 蛋白; 本次结果展示 3 次独立实验中的 1 次, \*  $P=0.0487$ ,  $< 0.05$ , \*\*\*  $P=0.0006$ ,  $< 0.001$

Figure 2-11 SNAP25 identification results in EL-HN cleavage neuro-2a

a) Western blot detects SNAP25 in different fragments cleavage neuro-2a; b) Efficiency analysis of EL-HN-SC and EL-HN-DC cleavage of SNAP25

Note: The EL of 300 nM in lane 1 was used as the negative control of this experiment; BoNT/E of 300 nM in lane 2 served as the positive control for this experiment; The blue arrow refers to the uncut SNAP25, while the black arrow refers to the cleaved SNAP25. The results of this show 1 of the 3 independent experiments, \*  $P=0.0487$ ,  $< 0.05$ , \*\*\*  $P=0.0006$ ,  $< 0.001$

### 2.3.7 EL-HN 分子在小鼠体内的活性

本实验制备的 EL-HN 分子在蛋白和细胞水平表现出一定的活性, 进一步通过测定其对小鼠的半数致死剂量  $LD_{50}$  来评价其在体内的活性。为与其它血清型肉毒毒素进行比较, 本研究也同时检测 A、B、F 三种血清型肉毒毒素的 L-HN 分子的  $LD_{50}$ 。SPSS 计算 4 种 L-HN 分子的  $LD_{50}$ , 具体结果见表 2-9, 其中 EL-HN-SC 的  $LD_{50}$  为 100  $\mu\text{g}$ , 而 EL-HN-DC 分子  $LD_{50}$  为 0.5  $\mu\text{g}$ ; AL-HN-SC 的  $LD_{50} > 100 \mu\text{g}$ , AL-HN-DC 的  $LD_{50}$  为 25  $\mu\text{g}$ , BL-HN 单链分子的  $LD_{50} > 500 \mu\text{g}$ , 双链分子  $> 100 \mu\text{g}$ ; FL-HN 单链分子  $> 100 \mu\text{g}$ , 双链分子约为 10  $\mu\text{g}$ 。以上

数据显示, A、B、E、F 型肉毒毒素的 L-HN 分子在小鼠体内的活性存在差异。4 种血清型肉毒毒素的双链分子的活性均要高于单链, 尤其是 EL-HN 分子, 双链的活性约是单链的 200 倍。在小鼠体内双链 EL-HN 分子也显示出较强的活性, 结合细胞水平实验, 进一步表明 EL-HN 能够发挥出和全长肉毒毒素分子相似的功能, 也证明 HN 结构域可起到与 Hc 结构域相似的作用。

表 2-9 肉毒毒素重组 L-HN 功能片段神经毒力

Table 2-9 Neurotoxicity of recombinant L-HN functional fragments of BoNTs

血清型	功能片段	氨基酸序列	单链分子的 LD <sub>50</sub>	双链分子的 LD <sub>50</sub>
BoNT/A	AL-HN	1-868	> 100 μg	25 μg
BoNT/B	BL-HN	1-852	> 500 μg	100 μg
BoNT/E	EL-HN	1-840	100 μg	0.5 μg
BoNT/F	FL-HN	1-858	> 100 μg	10 μg

注: LD<sub>50</sub>: 半数致死量 (median lethal dose)

### 2.3.8 EL-HN 分子与 SV2C (L4) 的结合能力

为证明 EL-HN 分子进入细胞的机制, 通过酶联免疫法对 EL-HN 进行受体结合实验。根据肉毒毒素的双受体模型, GT1b 可作为 BoNT/E 的第一受体。在研究 EL-HN 与 GT1b 的结合作用中, 我们以 AHc、EHc 以及 BoNT/E 为阳性对照, 牛血清白蛋白 (BSA) 为阴性对照, ELISA 结果见图 2-12a。实验发现 EL-HN 分子与 GT1b 的结合能力极弱, 推测 GT1b 可能不与 EL-HN 分子结合或结合能力极低。BoNT/E 的第二受体为 SV2 蛋白, 根据文献报道, neuro-2a 细胞只表达 SV2 蛋白中的 C 亚型 (SV2C), 且肉毒毒素主要结合 SV2 蛋白的 L4 区, 于是我们构建了 pTIG-Trx-SV2C (L4) -His 质粒并对其进行了表达纯化及鉴定。SV2C 可与 A 型肉毒毒素高亲和力结合, 实验前期以 AHc 为阳性对照进行分析, ELISA 结果表明, 在梯度包被 SV2C (L4) 后, EL-HN 及 EHN 和 SV2C (L4) 共孵育后, EL-HN 及 EHN 呈现出剂量依赖效应, 表明 EL-HN 有与 SV2C 结合的能力, 但是和 AHc 相比, 结合活性不如 AHc 活性高。之后为了进一步研究 HN 上与 SV2C 结合的区域, 前期构建并表达了 EHN<sub>423-699</sub> 以及 EHN<sub>700-840</sub> 这两个重组蛋白, 并通过 ELISA 分析, 结果初步显示, EHN<sub>700-840</sub> 和 SV2C (L4) 的结合程度与阴性对照 BSA 的基本一致而 EHN<sub>423-699</sub> 显示出一定的结合能力, 但是结合能力不如阳性对照, 实验结果图见图 2-12b。以上实验初步表明 E 型肉毒毒素 HN 结构域上与 SV2C 结合的区域可能主要存在于 E 型肉毒毒素的 423 到

699 氨基酸之间。

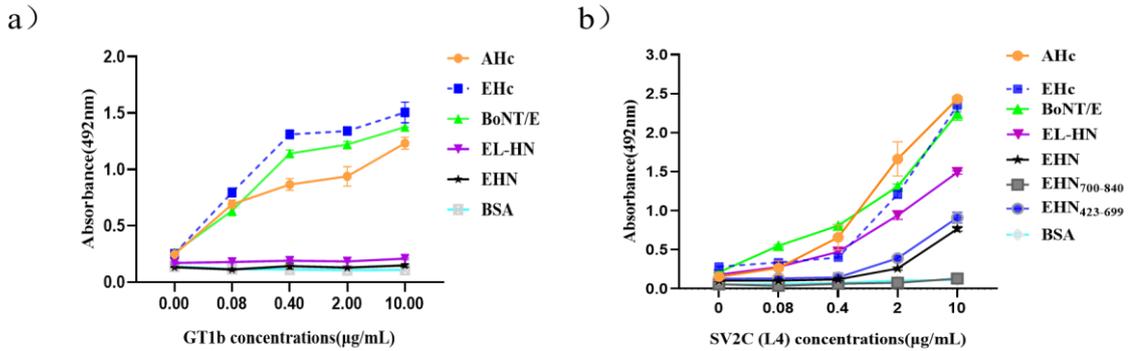


图 2-12 肉毒毒素相关蛋白的结合活性检测

a) 肉毒毒素相关蛋白和 GT1b 的结合能力；b) 肉毒毒素相关蛋白和 SV2C (L4) 的结合能力

Figure 2-12 Detection of binding activity of botulinum toxin-related proteins

a) Binding ability of botulinum toxin-related protein to GT1b; b) Binding ability of botulinum toxin-related protein and SV2C(L4)

### 2.3.9 EL-HN 和 neuro-2a 的结合作用分析

采用免疫荧光技术进一步验证 EL-HN 与 SV2C 的结合。以 neuro-2a 为实验模型，将 EL-HN 和细胞共培养约 2 h，之后通过固定，通透，封闭，以 EL-HN 小鼠血清为一抗，并标记为绿色荧光，实验结果见图 2-13a。绿色荧光代表 EL-HN 分子，可以看出其分布在细胞膜和细胞质周围，而阴性对照 EL 没有检测到绿色荧光信号，该结果进一步表明 EL-HN 可和 neuro-2a 细胞结合。然后为了进一步研究 EL-HN 分子和 SV2C 的结合，进行了 EL-HN 和 SV2C 共定位分析，实验结果见图 2-13b，其中绿色荧光表示 EL-HN 蛋白，红色荧光信号代表 SV2C 分子，橙色信号是 EL-HN 和 SV2C 重叠的部分，该实验结果可进一步证明 EL-HN 能与 SV2C 结合，实验中 A549 细胞为阴性对照。

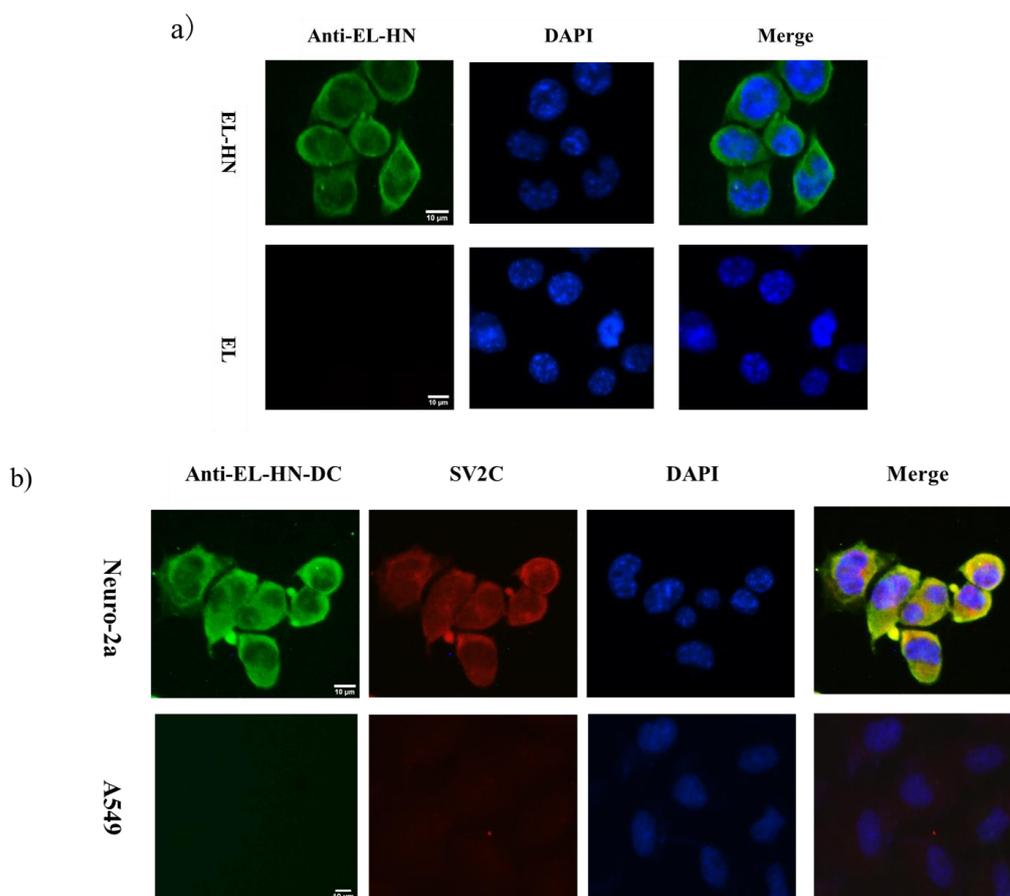


图 2-13 免疫荧光检测 EL-HN 和 neuro-2a 的相互作用

a) EL-HN 或 EL 在 neuro-2a 中的分布; b) EL-HN 和 SV2C 的共定位分析

注: 图中 EL 和 A549 细胞为阴性对照; 标尺为 10 μm。

Figure 2-13 Immunofluorescence detection of interaction between EL-HN and neuro-2a

a) Distribution of EL-HN or EL in neuro-2a; b) Colocalization analysis of EL-HN and SV2C

Note: EL and A549 cells are negative controls. The scale bar is 10 μm.

### 2.3.10 过量 HN 和 SV2C 抑制 EL-HN 蛋白切割细胞 SNAP25

为进一步确定 EHN 具有和神经细胞结合的功能以及确定 EL-HN 可以和 SV2C 结合, 我们在细胞水平进行了相应的抑制实验。在研究 EHN 具有和 neuro-2a 结合的能力时, 在 EL-HN 分子加入培养基前 4 h, 将过量的 EHN 放到培养基中, 待加入 EL-HN 之后, 继续共培养 12 h, 实验结果通过 Western blot 进行分析 (结果见图 12-4a)。在研究 EL-HN 和 SV2C 结合的实验中, 提前将 EL-HN 和过量的 SV2C (L4) 蛋白在 37°C 共孵育 30 min, 使得 EL-HN 可以提前和 SV2C (L4) 结合, 以阻断 EL-HN 对细胞的结合能力, 之后再二者一起和 neuro-2a 细胞共培养, Western blot 分析细胞中 SNAP25 被切割的情况, 实验结

果具体见图 2-14b。图中蓝色箭头代表未切割 SNAP25，黑色箭头代表被切割的 SNAP25，结果显示，过量的 EHN 提前和细胞孵育以及过量 SV2C (L4) 提前和 EL-HN 孵育，均在一定程度上抑制了 EL-HN 切割 SNAP25 的能力，与对照组相比抑制率分别为 55% 和 45%， $P$  值分别为  $< 0.01$  和  $< 0.05$ 。这表明 HN 结构域和 SV2C 在 EL-HN 分子与 neuro-2a 细胞之间相互作用的过程中发挥着重要作用。

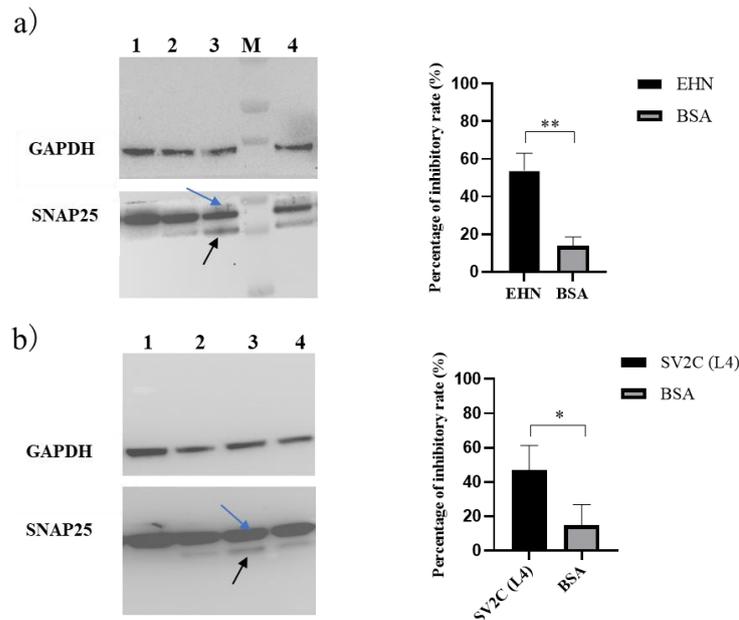


图 2-14 EL-HN-DC 结合活性的抑制实验

a) EHN 对 EL-HN-DC 的抑制作用；b) SV2C (L4) 对 EL-HN-DC 的抑制作用

注：图 a) 中各泳道分别为：1: EL-HN-DC 0 nM；2: 60 nM EL-HN-DC + 过量 EHN；3: 60 nM EL-HN-DC；4: 60 nM EL-HN-DC+BSA；M 为蛋白 Marker；图 b) 中各泳道分别为：1: EL-HN-DC 0 nM；2: 60 nM EL-HN-DC + 过量 SV2C (L4)；3: 60 nM EL-HN-DC；4: 60 nM EL-HN-DC+BSA；蓝色箭头指的是未被切割的 SNAP25 蛋白，黑色箭头代表已被切割的 SNAP25 蛋白；\*  $P=0.04 < 0.05$ ，\*\*  $P=0.002 < 0.01$

Figure 2-14 Inhibition test of EL-HN-DC binding activity

a) Inhibitory effect of EHN on EL-HN-DC; b) Inhibitory effect of SV2C (L4) on EL-HN-DC

Note: Each lane in Figure a) is: 1: EL-HN-DC 0 nM; 2:60 nM EL-HN-DC + excess EHN; 3:60 nM EL-HN-DC; 4:60 nM EL-HN-DC+BSA; M is protein Marker; Figure b) Each lane is: 1: EL-HN-DC 0 nM; 2:60 nM EL-HN-DC + excessive SV2C (L4); 3:60 nM EL-HN-DC; 4:60 nM EL-HN-DC+BSA; The blue arrow refers to the uncleaved SNAP25, while the black arrow refers to the cleaved SNAP25; \*  $P=0.04 < 0.05$ ,

\*\*  $P=0.002 < 0.01$

## 2.4 分析及讨论

肉毒毒素结合并进入神经细胞后，L 链切割 SNARE 蛋白，从而抑制乙酰胆碱的释放，导致麻痹<sup>[67]</sup>。肉毒毒素进入神经细胞产生毒性作用通常需要 4 个步骤：与神经细胞表面的受体结合，内化，L 链易位和切割底物蛋白<sup>[68-70]</sup>。

在本研究中，利用大肠杆菌表达系统制备了 EL-HN 分子，然后在体外利用胰蛋白酶制备双链 EL-HN 分子，最后在蛋白、细胞和小鼠体内研究 EL-HN 的活性。EL-HN 分子在蛋白和细胞水平都能切割底物蛋白 SNAP25；进一步通过测定体内的 LD<sub>50</sub> 来评价其在体内的生物活性，并与其它三种血清型 L-HN 分子进行了对比，发现 EL-HN 在小鼠体内的活性最强。结合小鼠体内、细胞和蛋白三个水平的实验，EL-HN 表现出和全长肉毒毒素相似的功能活性。为验证 HN 结构域是否能够发挥和受体结合的作用，结合肉毒毒素双受体模型，首先分析了 EL-HN 和低亲和力受体 GT1b 的结合活性，通过 ELISA 法进行验证，发现 EL-HN 或者 EHN 未表现出结合活性。之后研究 EL-HN 与高亲和力受体 SV2 的结合能力，结合本研究选取的细胞模型，构建和 Trx 蛋白融合的 SV2C (L4) 质粒，SV2C (L4) 和 Trx 融合后蛋白的表达量得到了显著提高，ELISA 结果显示 EL-HN 或 EHN 和 SV2C (L4) 具有一定的结合活性，但与 AHc 及 EHc 相比，结合活性相对较弱，这个结果也提示 EL-HN 的细胞学活性和动物毒性与全长毒素相比较弱。此外，研究了 HN 结构域上与 SV2C 结合的特异性位点，实验结果初步表明该位点位于 E 型肉毒毒素的 423-699 氨基酸之间，并通过细胞免疫荧光和细胞学阻断实验进一步明确了 HN 和 SV2C 的结合能力。

先前的研究表明肉毒毒素需要一个完整的结构才能发挥其完全神经毒性作用<sup>[71]</sup>，然而在 A 型肉毒毒素的研究中，发现缺少 Hc 结构域，仅在 HN 的作用下 L 链就可以被转运到细胞质中发挥作用<sup>[23]</sup>。Ayyar 等对 A 型肉毒毒素的研究结果表明，不仅是 Hc 结构域，HN 结构域也可以和受体结合，并且在肉毒毒素中毒的过程中发挥着重要作用<sup>[62, 64]</sup>，Masuyer 等人发现 B 型肉毒毒素的 BL-HN 分子保留有内化和切割细胞底物蛋白的能力<sup>[72]</sup>。而在本研究中，我们发现缺少 Hc 结构域的 EL-HN 分子也能对动物产生神经毒性，推测 HN 结构域可能与受体结合，这与 Hc 结构域的作用相似，本实验结果与以上研究结果相符。本研究也初步分析了单链 EL-HN 和双链 EL-HN 的作用差异。单链肉毒毒素的毒力低，但在相关蛋白酶的作用下形成由单个二硫键连接而成的双链分子时，在动物体内的神经毒力显著增强<sup>[46]</sup>。在我们的研究当中也观察到 A、B、E 和 F 四种血清型肉毒毒素的 L-HN 片段在激活成双链分子后，在动物体内的毒力同样增强。目前只有一篇文献报道，重组的 A 型肉毒毒素双链 L-HN 片段的 LD<sub>50</sub> 估计约为 150 μg/只小

鼠，而单链 L-HN 片段没有毒性<sup>[73]</sup>。本实验结果发现，在四种血清型 L-HN 分子中，EL-HN 的神经毒力最强，AL-HN、BL-HN 和 FL-HN 次之，且 EL-HN 双链的毒力是单链的 200 倍。通过和其它三种 L-HN 对比，EL-HN 表现出较高的神经毒力，这可能与 BoNT/E 或 EL-HN 的分子结构有关。在体外探究 EL-HN 切割 SNAP25 实验中，单链的 EL-HN 分子在蛋白水平也能有效切割 SNAP25 分子，这与其在动物体内表现出的低神经毒力有区别。前期本课题组在 FL-HN 的研究中发现，单链 FL-HN 无法切割 neuro-2a 中的 VAMP 蛋白，但单链 EL-HN 却可以切割 SNAP25 分子，这可能与两者的结构相关。除此之外，在细胞水平上，双链 EL-HN 的切割效率比单链分子高 2 倍，而在动物体毒力方面却高出 200 倍，这种差异可能是体内和体外环境的差异导致的。

在细胞水平上，EL-HN 分子也可以结合并进入神经细胞切割 SNAP25，而缺失 HN 结构域的 EL 却不能切割 SNAP25，这表明 HN 参与了结合过程。虽然我们的研究表明，HN 可以起到 Hc 相似的功能，但 EL-HN 也有可能通过其他途径进入细胞，如非依赖于 HN 的内吞作用。为了进一步证明 EL-HN 片段参与了与神经细胞结合的过程，我们在细胞水平上使用免疫荧光实验分析了 EL-HN 在 neuro-2a 细胞中的分布，我们发现 EL-HN 分布在 neuro-2a 细胞的膜和细胞质中，而对照 EL 则没有。此外，以非神经细胞系 A549 细胞为阴性对照，结果证明 EL-HN 不能通过内吞途径进入非神经细胞。我们的结果为 EHN 结构域具有受体结合功能提供了有力的证据。

肉毒毒素结合细胞膜上的受体进入神经元细胞，根据目前的双受体理论，BoNT 首先与低亲和力受体神经节苷脂（GT1b 等）结合，然后与高亲和力突触囊泡蛋白（SV2）结合<sup>[74-76]</sup>。目前，BoNT/A 和 BoNT/E 的第二受体被鉴定为 SV2<sup>[55]</sup>，其中 SV2 的三种亚型（SV2A、B 和 C）都可以作为 BoNT/A 的受体，而 BoNT/E 可能只或主要利用 SV2A 和 SV2B 作为第二受体。前期发现 EL-HN 与 GT1b 的结合能力非常弱，然后我们以 SV2 蛋白为研究对象。据报道，neuro-2a 细胞仅表达 SV2C<sup>[71]</sup>，因此，我们表达重组 SV2C（L4）蛋白，并探讨其作用。ELISA 检测 HN 和 SV2C 结合以及过量 HN、SV2C 抑制 EL-HN 分子活性的结果表明，EHN<sub>423-699</sub> 或 BoNT/E 的 HN 结构域在与神经细胞结合的过程中起着重要作用，这与 BoNT/A 的 HN 结构域的作用一致<sup>[64]</sup>。

此外，EL-HN 和 SV2C 的共定位分析表明，EL-HN 或 HN 结构域可能在体内与 SV2C 结合，这与以往 BoNT/E 可能仅或主要利用 SV2A 和 SV2B 的研究不一致。我们推测，这种不一致可能是由于使用了不同的细胞模型造成的。在本研究中使用了 neuro-2a 细胞，而在之前的研究中使用了小鼠原代神经细胞，这些细胞能够表达 SV2A 和 SV2B 受体蛋白。然而，BoNT/E 或 EL-HN 可以进入仅表达

SV2C 的 neuro-2a 细胞，提示 SV2C 可能也在 BoNT/E 的结合中发挥作用。我们推测，SV2C 可能在 SV2A 和 SV2B 受体蛋白不存在时，在结合和介导毒素进入神经细胞中发挥替代作用。

## 2.5 小结

(1) 利用大肠杆菌表达的重组 EL-HN 分子，在缺失 Hc 结构域的情况下，表现出良好的体内外活性。尤其在动物体内，EL-HN 的神经毒力要明显高于其他三种血清型相应分子 (AL-HN、BL-HN 及 FL-HN)。

(2) EL-HN 经胰蛋白酶激活后，双链 EL-HN 的体内外活性比单链 EL-HN 高。

(3) 高剂量的 EL-HN 能够进入 neuro-2a 细胞，发挥着和全长 BoNT/E 相似的功能，结合体内实验的结果，表明 HN 具有和 neuro-2a 细胞结合并将 L 转运到细胞质的能力，BoNT/E 的 HN 可能在与神经细胞结合的过程中起着重要作用。

(4) EL-HN 和 SV2C 的结合相关实验表明，EL-HN 或 HN 可能结合 SV2C，并且结合的区域可能位于 EHN<sub>423-699</sub>。

本研究的结果总结见图 2-15。

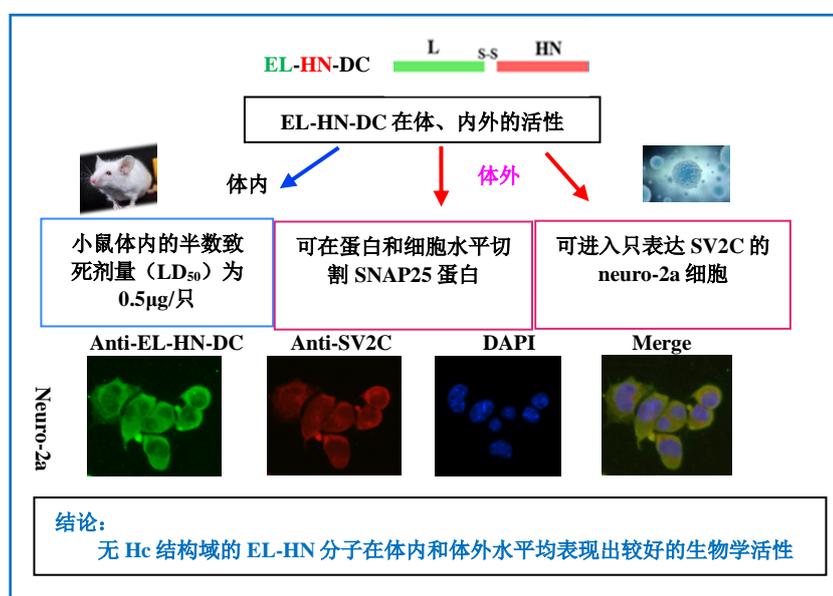


图 2-15 研究结果示意图

Figure 2-15 Schematic diagram of the results of the study

### 3 E型肉毒毒素与SV2C的结合作用研究

肉毒毒素与神经细胞表面受体结合是肉毒毒素进入细胞内发挥麻痹作用的第一步，除已确定神经节苷脂是肉毒毒素的结合受体外，有证据表明肉毒毒素还存在其它受体。其中 BoNT/A 和 BoNT/E 的第二受体被确定 SV2，并且主要是和 SV2 蛋白的第四管腔区域（L4）结合<sup>[55]</sup>。SV2 蛋白有 A、B 和 C 三种亚型，目前已有研究表明 E 型肉毒毒素可能和 SV2A、SV2B 高亲和力结合，从而介导其进入神经细胞内，但其具体的作用机制仍需进一步探究<sup>[20]</sup>。在本课题组的前期研究过程中，发现 EHc 及 BoNT/E 在体外表现出能和重组 SV2C（L4）高度结合的趋势，并且也能进入只表达 SV2C 分子的 neuro-2a 细胞。为进一步分析 SV2C 和 E 型肉毒毒素的结合，以 SV2B（L4）分子作为对照，通过 ELISA 和 pull down 实验技术验证 BoNT/E 与 SV2C 的结合作用。Pull down 实验是一种可在体外有效验证蛋白相互作用的实验技术，分别通过 BoNT/E 捕获 SV2C（L4），SV2C（L4）捕获 EHc 以及 BoNT/E 捕获神经细胞中的 SV2C 来研究 BoNT/E 与 SV2C 的结合作用。除此之外，还利用表达 SV2A 和 SV2C 的人神经母细胞瘤细胞（SH-SY5Y）<sup>[77]</sup>为模型进行细胞水平切割 SNAP25 实验，并和 neuro-2a 细胞的切割效率进行对比。另外有研究表明 SV2 蛋白的糖基化修饰对 E 型肉毒毒素的结合过程起着重要作用<sup>[17]</sup>，因此本研究也探究了糖基化对 SV2 蛋白与 E 型肉毒毒素结合的影响，构建重组真核 SV2A（L4）、SV2B（L4）及 SV2C（L4）表达载体，之后转染到 HEK 293F 中，利用 HEK 293F 细胞表达目的蛋白，纯化后进一步通过 ELISA 和 pull down 实验来分析。

#### 3.1 实验材料

##### 3.1.1 主要仪器

本章节实验所使用的主要仪器同 2.1.1。

##### 3.1.2 实验试剂

本章节实验所使用的主要试剂见表 3-1。

表 3-1 实验所需的主要试剂

Table 3-1 Main reagents required for experiments

试剂耗材	生产厂家
Strep-tag 纯化柱	IBA
MagStrep “type3” XT Beads	IBA
10×Buffer BTX Elution Buffer	IBA
pTSE-Twin Strep-tag 表达载体	实验室保存
pTSE-hFc 表达载体	实验室保存
SV2C 抗体	Immunoway
neuro-2a	普诺赛
SH-SY5Y	普诺赛
BoNT/E	本实验室制备并保存
BoNT/A	本实验室制备并保存
AHc 蛋白	本实验室制备并保存
EHc 蛋白	本实验室制备并保存
Trx-SV2C (L4) -Twin Strep 蛋白	本实验室制备并保存

其它主要试剂和耗材同 2.1.2

### 3.1.3 溶液配制

(1) Twin Strep 纯化结合缓冲液: 0.1 M Tris-Cl (pH 8.0); 0.15 M NaCl; 0.001 M EDTA

(2) 1×Twin Strep 洗脱缓冲液: 将 10×Buffer BTX Elution Buffer 和去离子水按照 1: 9 的比例进行稀释。

(3) 1 L 的 0.1 M 柠檬酸

取固体柠檬酸 21.01 g 于烧杯中, 加入适量去离子水, 待固体完全溶解后, 定容至 1 L。

(4) 1 L 的 0.1 M 柠檬酸三纳

取固体柠檬酸三纳 29.41 g 于烧杯中, 加入适量去离子水, 待固体完全溶解

后，定容至 1 L。

(5) 柠檬酸洗脱液

取 300 mL 的 0.1 M 柠檬酸和 70 mL 的 0.1 M 柠檬酸三钠，混合均匀后，用 HCl 调节 pH 到 3.0 后备用。

其它主要溶液的配制同 2.1.3。

### 3.1.4 片段与引物的合成

原核表达系统：

利用密码子优化软件 JCat 对 SV2B (L4) (372 bp) 序列进行优化, 将密码子优化为大肠杆菌表达系统的优势密码子, 并在各目的片段的两端分别引入酶切位点 *EcoRI*和 *XhoI*, 由北京六合华大基因科技有限公司进行全基因的合成, 基因片段设计见表 3-2。

表 3-2 基因序列

Table 3-2 Gene sequences

基因名称	序列	片段大小
SV2B (L4)	<p><u>GAATTC</u>CCGGATATGATTCGCTATTTTCAGGATGAGGA            ATACAAGAGCAAATGAAGGTGTTTTTCGGCGAACAT            GTTCACGGTGCAACCATTAATTTTACCATGGAGAATCA            GATCCACCAGCACGGTAAACTGGTTAATGATAAATTCA            TTAAGATGTACTTCAAGCACGTGCTGTTTGAGGACACC            TTTTTCGACAAATGTTATTTTCGAGGACGTTACCAGCAC            CGACACCTATTTTAAAAATTGCACCATCGAGAGCACCA            CCTTTTATAATACCGATCTGTATAAGCACAAAGTTCATCG            ACTGCCGCTTTATTAATAGCACCTTTCTGGAACAGAAA            GAGGGCTGTCATATGGATTTTGAGGAGGATAATGACCT  <u>CGAG</u></p>	372 bp

真核表达系统：

利用密码子优化软件 JCat 对 SV2A<sub>469-598</sub>、SV2B<sub>412-535</sub> 及 SV2C<sub>459-578</sub> 序列进行优化, 将密码子优化为人源的优势密码子, 并在各目的片段的两端分别引入酶切位点 *SalI* 和 *NheI*, 由北京六合华大基因科技有限公司进行全基因的合成, 基

因片段设计见表 3-4。

表 3-4 基因序列

Table 3-4 Gene sequences

基因名称	序列	片段大小
Z-SV2A <sub>468-595</sub>	<p><u>GTCGAC</u>cgggCCTGACATGATCCGACATTTGCAGGCTGTG            GATTATGCCGCACGAACTAAGGTATTTCCAGGCGAGAGG            GTGGAACATGTTACATTCAATTTTACACTGGAGAATCAG            ATCCACAGAGGCGGACAGTATTTTAATGACAAGTTTATC            GGGCTTAGACTGAAGAGCGTTAGCTTCGAGGACAGCCT            CTTTGAGGAATGCTACTTTGAGGACGTCACAAGCTCTAA            TACCTTCTCCGCAACTGTACCTTTATCAACACAGTGTTT            TACAACACCGACCTCTTCGAGTATAAGTTCGTTAATTCTA            GACTGGTGAATAGCACATTTCTGCACAATAAGGAGGGCT            GTCCTCTGGACGTTACAGGGACGGGAGAGGGGGCATA            TATGGTGTATGCTAGC</p>	384 bp
Z-SV2B <sub>412-535</sub>	<p><u>GTCGAC</u>cgggCCTGACATGATCAGGTACTTCCAGGATGAG            GAGTATAAAAGCAAAATGAAGGTGTTTTTGGTGAACAT            GTGCATGGCGCCACCATCAACTTTACGATGGAGAACCAA            ATACATCAGCACGGGAAGCTCGTTAACGATAAGTTTATC            AAAATGTAAGTCAAGCATGTGCTCTTCGAAGATACGTTT            TTCGACAAATGCTACTTTCGAAGACGTCACCAGCACCGAT            ACATATTTCAAAAATTGCACCATCGAATCCACTACCTTCT            ACAATACTGACCTGTATAAACACAAATTCATTGACTGCA            GATTTATCAACAGCACATTTCTTGAGCAGAAAGAGGGAT            GCCACATGGATTTTCGAAGAAGATAATGATGCTAGC</p>	372 bp
Z-SV2C <sub>495-578</sub>	<p><u>GTCGAC</u>cgggATGGAGTACGACAACGGAAGGTTTCTGGGA            GTTAAGTTCAAGTCCGTGACATTCAAAGATTCTGTTTTT            AAGAGCTGTACGTTTGATGATGTCACCTCTGTGAACACC            TATTTTAAGAATTGTACTTTTATAGATACTTTGTTCGAGAA            CACCGACTTCGAACCTTACAAGTTCATAGACTCAGAATT            TCAGAATTGCTCCTTTCTCCATAATAAAACCGGCTGCCA            AATCACTTTTGACGATGACTACTCT  <u>GCTAGC</u></p>	252 bp

## 3.2 实验方法

### 3.2.1 原核表达载体的构建

原核表达载体的构建具体实验方法同 2.2.1。

### 3.2.2 真核表达载体的构建

将目的片段和 pTSE 表达载体通过限制酶 *SalI* 和 *NheI* 进行双酶切，双酶切体系见表 3-5。之后通过连接，转化，挑克隆，提质粒送公司测序鉴定，最后用无内毒素小提中量试剂盒提取质粒。

表 3-5 酶切反应体系

Table 3-5 Enzyme digestion reaction system

试剂/DNA	质量/体积
载体/片段	1 μg/0.5 μg
<i>SalI</i> (20000 units/mL)	1 μL
<i>NheI</i> (20000 units/mL)	1 μL
10×Cutsmart	5 μL
双蒸水	补齐至 50 μL

### 3.2.3 目的蛋白在原核表达系统的表达

同 2.2.2 目的蛋白的表达。

### 3.2.4 目的蛋白在真核表达系统的瞬时表达

HEK 293F 细胞使用 FreeStyle™ HEK 293 培养基进行培养，细胞在 37°C、5% CO<sub>2</sub>、125 r/min 的环境下生长。待 HEK 293F 细胞生长至 1×10<sup>6</sup> cells/mL 时，进行转染，取培养体积的 0.8 倍的质粒及等体积的转染试剂（FectoPRO DNA Transfection）与 3 mL opti-MEM 培养基混合均匀后，静置 15 min，之后加到培养基中，细胞继续摇床培养。转染 72 h 后，4°C，8000 r/min 离心 15 min，收集上清液。将上清用 0.45 μm 滤膜过滤，用于后续纯化。

### 3.2.5 带 Twin Strep 标签蛋白的纯化

使用 AKTA Purif 100 系统进行纯化。

柱平衡：将 Strep-tag 纯化柱安装到纯化仪后，使用 Twin Strep 纯化结合缓冲液平衡纯化柱。

上样：设置 1 mL/min 的流速使得过滤好的样品上清穿过纯化柱。

洗脱：待样品全部穿过后，用约 5 个柱体积的 Twin Strep 纯化结合缓冲液冲洗纯化柱，之后使用 Twin Strep 纯化洗脱缓冲液进行目的蛋白的洗脱。

脱盐：将目的蛋白置换到 PBS 缓冲液中。

对洗脱下的目的蛋白进行 SDS-PAGE 鉴定。

### 3.2.6 Mabselct 亲和层析法纯化目的蛋白

柱平衡：将 HiTrap™ Mabselct SuRe 纯化柱安装到纯化仪后，使用 PBS 缓冲液冲洗至柱平衡。

上样：设置 1 mL/min 的流速使得过滤好的细胞上清穿过纯化柱。

洗脱：以 5-10 倍柱体积的 PBS 平衡纯化柱后，用柠檬酸洗脱液进行目的蛋白的洗脱。

脱盐：将目的蛋白置换到 PBS 缓冲液中。

对洗脱下的目的蛋白进行 SDS-PAGE 鉴定。

### 3.2.7 ELISA 法检测 E 型肉毒毒素与 SV2C 的结合

具体实验方法同 2.3.8。

### 3.2.8 蛋白互作-pull down 检测 E 型肉毒毒素与 SV2C 的结合

将 MagStrep “type3” XT Beads 磁珠混匀后，吸取 50  $\mu$ L 于 2 mL EP 管中，置于磁力架上磁珠吸附，弃上清。用 400  $\mu$ L Wash Buffer（1 M Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA）洗涤两次，弃上清。

将 50  $\mu$ g 带有 Twin Strep 标签的蛋白和磁珠混合，用 Wash Buffer 补齐 400  $\mu$ L，4°C 摇床孵育 1 h。同时设置不加 Twin Strep 标签的蛋白与磁珠孵育用作阴性对照。用 400  $\mu$ L Wash buffer 洗涤 2 次，弃上清。

将 100  $\mu$ g 的目的蛋白或 200  $\mu$ L 细胞裂解液和磁珠混合，用 Wash Buffer 补

齐 400  $\mu\text{L}$ , 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育 3 h, 400  $\mu\text{L}$  Wash Buffer 洗涤 3 次, 弃上清。

之后取 50-100  $\mu\text{L}$  的 Elution buffer 洗脱 10 min, 取上清进行蛋白电泳或者 Western blot 实验。

### 3.2.9 细胞水平检测 E 型肉毒毒素的活性

方法同 2.2.6。

### 3.2.10 统计学分析

方法同 2.2.11。

## 3.3 实验结果

### 3.3.1 Trx-SV2B (L4) 的表达

通过 *EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切, SV2B (L4) 片段和 pTIG-Trx-Twin Strep-tag 载体连接, 转化, 挑克隆, 提质粒并送公司测序, 保存测序正确质粒。将 pTIG-Trx-SV2B (L4) -Twin Strep-tag 转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 中进行表达, 之后通过 Strep 标签蛋白纯化方法, 成功纯化出 Trx-SV2B (L4) 蛋白, Trx-SV2B (L4) 的 SDS-PAGE 结果见图 3-1, 蛋白纯度和浓度能够满足后续蛋白互作-pull down 实验的需要。

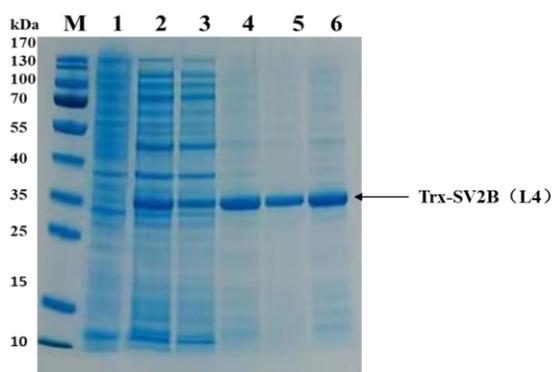


图 3-1 pTIG-Trx-SV2B (L4) -Twin Strep-tag 纯化后 SDS-PAGE 鉴定

注: M: 蛋白 Marker; 1: 未诱导表达破碎上清; 2: 诱导表达破碎上清; 3: 穿过液; 4: 脱盐前蛋白 5-6: 脱盐后蛋白

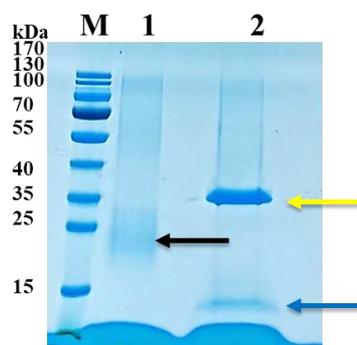
Figure 3-1 SDS-PAGE identification of purified pTIG-Trx-SV2B(L4)-Twin Strep-tag

Note: M: Protein Marker; 1: Crushed supernatant without induced expression; 2: pTIG-Trx-SV2A<sub>469-598</sub>-His induced expression supernatant; 3: The remaining liquid passing through the column 4: Unsalted protein; 5-6: Desalted protein

### 3.3.2 真核系统表达目的蛋白

(1) SV2A<sub>469-598</sub>-Twin Strep-tag、SV2B<sub>412-535</sub>-Twin Strep-tag 和 SV2C<sub>459-578</sub>-Twin Strep-tag 的表达纯化

优化 SV2A<sub>469-598</sub>、SV2B<sub>412-535</sub> 及 SV2C<sub>459-578</sub> 序列并在片段的两端分别引入酶切位点 *SalI* 和 *NheI*，由北京六合华大基进行全基因的合成。双酶切后将目的片段与 pTSE-Twin Strep-tag 载体连接、转化，提质粒，双酶切鉴定，测序，成功构建 pTSE-SV2A<sub>469-598</sub>-Twin Strep-tag、pTSE-SV2B<sub>412-535</sub>-Twin Strep-tag 和 pTSE-SV2C<sub>459-578</sub>-Twin Strep-tag 质粒。将保存的质粒反复冻融三次后，取 24 μg 的质粒，通过转染试剂，转染到 30 mL HEK293 F 细胞中。转染后继续培养细胞，约 72 h 后可收集细胞。之后离心收集细胞上清，通过 Strep tag 纯化柱进行纯化，将目的蛋白置换到 PBS 缓冲液中，通过 SDS-PAGE 鉴定蛋白的表达和纯化情况。SV2A<sub>469-598</sub>-Twin Strep 和 SV2B<sub>412-535</sub>-Twin Strep 在纯化过程中没有洗脱出目的蛋白，SV2C<sub>459-578</sub>-Twin Strep 有少量目的蛋白洗脱，实验结果见图 3-2。其中泳道 1 为 SV2C<sub>459-578</sub>，显示蛋白浓度较低，并且分子量大于其理论分子量，推测蛋白可能经过糖基化修饰。泳道 2 是将洗脱下的蛋白通过 PNGF 去糖基化，发现在去除糖基化修饰后，蛋白的分子量大小约为 13 kDa，与理论值相符。虽然成功纯化出 SV2C<sub>459-578</sub> 蛋白，但蛋白浓度低。

图 3-2 SV2C<sub>459-578</sub>-Twin Strep 的 SDS-PAGE 鉴定

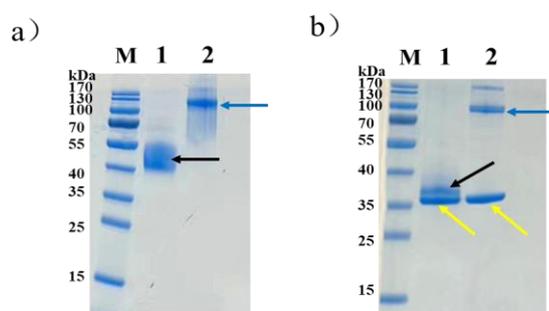
注：图中黑色箭头指的是 SV2C<sub>459-578</sub>；蓝色箭头指的是去糖基化后的 SV2C<sub>459-578</sub>；黄色箭头指的是 PNGF

Figure 3-2 SDS-PAGE identification of SV2C<sub>459-578</sub>-Twin Strep

Note: The black arrow in the figure refers to SV2C<sub>459-578</sub>; The blue arrow refers to SV2C<sub>459-578</sub> after deglycosylation; The yellow arrow refers to PNGF

## (2) SV2A<sub>469-598</sub>-Fc、SV2B<sub>412-535</sub>-Fc 和 SV2C<sub>459-578</sub>-Fc 的表达纯化

将目的蛋白和人源 IgG 的 Fc 片段进行融合，可以保留目的蛋白的生物活性，提高目的蛋白在真核哺乳细胞中的表达量，并且可以通过抗体的纯化方法进行目的蛋白的纯化。通过前期构建的 pTSE-SV2A<sub>469-598</sub>-Twin Strep-tag、pTSE-SV2B<sub>412-535</sub>-Twin Strep-tag 和 pTSE-SV2C<sub>459-578</sub>-Twin Strep-tag 质粒，经 *SalI* 和 *NheI* 酶切并回收目的片段，将目的片段和 pTSE-Fc 载体连接，成功构建 pTSE-SV2A<sub>469-598</sub>-Fc、pTSE-SV2B<sub>412-535</sub>-Fc 和 pTSE-SV2C<sub>459-578</sub>-Fc 质粒。在本实验中，将以上三种质粒转染到 HEK 293F 细胞中进行表达，之后离心取上清，通过 HiTrap<sup>TM</sup> MabSelect SuRe 纯化柱进行纯化，使用柠檬酸洗脱液进行目的蛋白的洗脱，并将目的蛋白置换到 PBS 缓冲液中。本实验中 SV2A<sub>469-598</sub>-Fc 和 SV2B<sub>412-535</sub>-Fc 在纯化过程中仍没有收集到目的蛋白，只成功纯化出 SV2C<sub>459-578</sub>-Fc 蛋白，并且目的蛋白的表达量较高，纯化出的目的蛋白最高浓度可达 1 mg/mL，对纯化出的目的蛋白在还原及非还原条件下进行了蛋白电泳，泳道 1 是还原电泳，泳道 2 是非还原电泳，实验结果见图 3-3a。抗体的 Fc 由两个 25 kDa 大小的分子通过一个二硫键连接，SV2C<sub>459-578</sub> 和 Fc 融合表达后在还原电泳下分子约为 38 kDa，非还原电泳条件下的分子量约为 68 kDa。SV2C<sub>459-578</sub>-Fc 的蛋白电泳表明，其分子量大于其理论分子量，推测目的蛋白经过了糖基化修饰。之后在非变性条件下进行了用 PNGF 去糖基化，去糖基后蛋白电泳结果见图 3-3b，1 号泳道为还原电泳，2 号泳道为非还原电泳，去糖基化后 SV2C<sub>459-578</sub>-Fc 的分子量和理论值相符。

图 3-3 SV2C<sub>459-578</sub>-Fc 的 SDS-PAGE 鉴定

a) 糖基化的 SV2C<sub>459-578</sub>; b) 去糖基化的 SV2C<sub>459-578</sub>

注：黑色箭头指的是还原电泳下的 SV2C<sub>459-578</sub>-Fc，蓝色箭头指的是非还原电泳下的 SV2C<sub>459-578</sub>，黄色箭头指的是 PNGF。

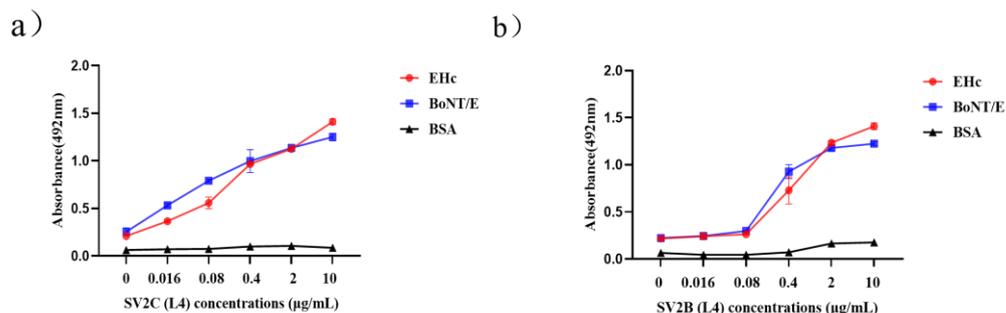
Figure 3-3 SDS-PAGE identification of SV2C<sub>459-578</sub>-Fca) Glycosylated SV2C<sub>459-578</sub>; b) deglycosylated SV2C<sub>459-578</sub>

Note: Note: The black arrow represents SV2C<sub>459-578</sub>-Fc under reduced electrophoresis, the blue arrow represents SV2C<sub>459-578</sub>-Fc under non reduced electrophoresis and the yellow arrow represents PNGF.

### 3.3.3 ELISA 法检测 E 型肉毒毒素与 SV2C 的结合

在 2.3.8 中通过 ELISA 检测各蛋白分子与 Trx-SV2C 的结合中, 发现 EHc 及 BoNT/E 蛋白也表现出和 SV2C 的高结合能力, 而目前对于 E 型肉毒毒素第二受体的研究, 认为 BoNT/E 可能仅仅和 SV2A 和 SV2B 高亲和力结合。通过分析比较 EHc、BoNT/E 与 SV2B 及 SV2C 的结合能力来为进一步分析全长 BoNT/E 是否能和 SV2C 结合。同制备 Trx-SV2C (L4) 蛋白一样, 我们构建并表达 Trx-SV2B (L4) 蛋白, 最终成功纯化出 Trx-SV2B (L4) 蛋白, 进而通过 ELISA 实验来分析及比较 EHc 及 BoNT/E 分别于 SV2B 和 SV2C 结合的能力。

ELISA 实验结果见图 3-4, 通过在酶标板上分别梯度包被 Trx-SV2B (L4) 和 Trx-SV2C (L4), 之后将过量 EHc 及 BoNT/E 与 SV2B (L4) 或 SV2C (L4) 共孵育 1 h, 洗涤非特异结合的蛋白, 再用可检测 EHc 及 BoNT/E 的马血清作为一抗, 二抗孵育后, 显色, 终止显色反应并用酶标仪检测在 492 nm 的吸光值。结果显示在包被 Trx-SV2B (L4) 或 Trx-SV2C (L4) 时, EHc 和 BoNT/E 与底物的结合趋势基本一致; EHc 和 BoNT/E 分别和 SV2B (L4) 及 SV2C (L4) 的结合趋势都表现出剂量依赖效应。由于我们表达的 SV2 蛋白是和 Trx 蛋白融合表达的, 为排除 Trx 蛋白的影响, 通过包被 Trx 蛋白 (本实验室前期制备并保存) 进一步通过 ELISA 检测, 实验结果见图 3-4c, ELISA 结果显示 BoNT/E、EL-HN 及 EHc 都未表现出和 Trx 蛋白的结合的能力, 说明 BoNT/E 等蛋白和 SV2C (L4) 的结合能力是特异。



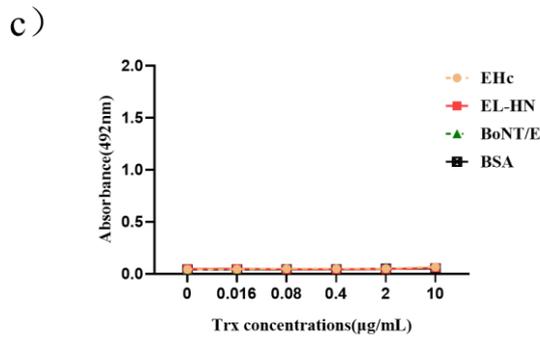


图 3-4 E 型肉毒毒素与 SV2 的结合活性检测

- a) E 型肉毒毒素和 SV2C (L4) 的结合能力; b) E 型肉毒毒素和 SV2B (L4) 的结合能力; c) E 型肉毒毒素相关蛋白和 Trx 蛋白的结合能力

Figure.3-4 Binding ability of BoNT/E to SV2

- a) The binding ability of BoNT/E to SV2C(L4); b) The binding ability of BoNT/E to SV2B (L4); c) Binding ability of BoNT/E associated protein and Trx protein

### 3.3.4 蛋白互作-pull down 检测 E 型肉毒毒素与 SV2C 的结合

前期通过间接 ELISA, 发现 EHC 及 BoNT/E 表现与 SV2C 结合的效应, 为进一步检测 SV2C 与 BoNT/E 的结合, 通过蛋白 pull down 技术进一步在体外验证两者的结合作用。MagStrep “type3” XT 磁珠包被有 Strep-Tactin®XT 可有效结合带有 Strep tag 的蛋白 (猎物蛋白), 之后将猎物蛋白和实验所研究的蛋白 (诱饵蛋白) 共孵育, 最后通过 SDS-PAGE 或免疫印迹检测。

将带 Twin Strep 标签的 BoNT/E 和磁珠结合后去捕获 SV2C (L4) -His 蛋白, 通过 SDS-PAGE 鉴定, 实验结果见图 3-5a, 泳道 3 是 BoNT/E 和 SV2C (L4) -His 结合后的结果, 发现有 SV2C (L4) -His 被洗脱下来, 泳道 4 是 BoNT/E 与 BSA, 泳道 5 是未加 BoNT/E 而只加 SV2C (L4) -His, 将泳道 3 与泳道 4, 5 进行对比, 说明洗脱下的 SV2C (L4) -His 是特异的。然后用带有 Twin Strep 标签的 SV2C (L4) (本实验室前期制备并保存) 作为猎物蛋白去捕获 EHC, 并通过 SDS-PAGE 鉴定, 实验结果见图 3-5b, 泳道 1 为 SV2C (L4) 和 EHC, 发现 EHC 有洗脱下来。实验同时设置 SV2C (L4) 与 AHc (泳道 2) 及 SV2B (L4) 与 EHC (泳道 3) 为阳性对照, 从泳道 1 和 2 发现 SV2C (L4) 和 AHc 的结合比 EHC 高, 从泳道 1 和泳道 3 可以看出, SV2B (L4) 和 SV2C (L4) 都可以捕获到 EHC, 且结合的强度基本一致, 泳道 4 是阴性对照, 表明 SV2C (L4) 和 EHC 的结合是特异的。由于 SV2C (L4) 蛋白是和 Trx 蛋白融合表达的, 为排除 Trx 的影响, 验证了 BoNT/E 和 Trx 结合 (本实验室前期制备并

保存), 实验结果见图 3-5c, 实验结果显示 Trx 蛋白未和 BoNT/E 结合。进一步用 BoNT/E 去捕获细胞中的 SV2C, BoNT/E 和磁珠结合后, 洗涤未被结合的蛋白, 将 SH-SY5Y 细胞裂解液和磁珠共孵育, 最后通过 Western blot 去检测 SV2C, 实验结果见图 3-5d, 其中 1 号泳道为 SH-SY5Y 细胞裂解液, 2 号泳道是用 BoNT/E 捕获细胞 SV2C 结果, 3 号泳道是 BoNT/A 捕获细胞 SV2C 结果, 泳道 4 是无 BoNT/E 或 BoNT/A 去捕获 SV2C 的结果, 4 号泳道没有条带表明 BoNT/E 捕获到的 SV2C 是特异的。SV2C 蛋白理论上的分子量约 82 kDa, 但是本实验通过 SV2C 兔多克隆抗体检测发现目的条带的分子量大于 100 kDa, 我们推测可能是由于糖基化修饰造成的, 本实验目前仍需进一步优化与确定。

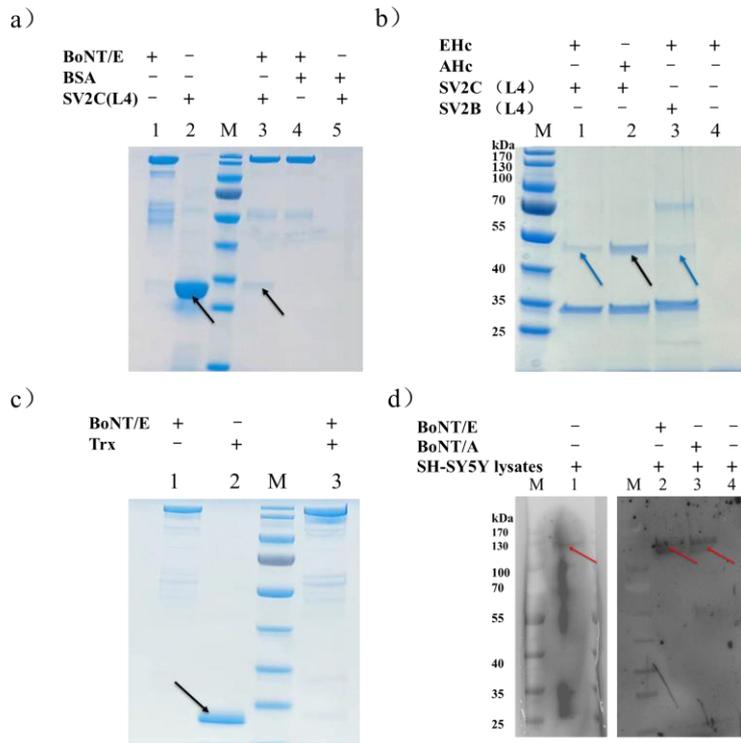


图 3-5 pull down 实验检测 E 型肉毒毒素和 SV2C 的结合

a) BoNT/E 和 SV2C (L4) 的相互作用; b) SV2C (L4) 和 EHC 的相互作用; c) SV2C (L4) 和 Trx 蛋白的相互作用; d) BoNT/E 和 SV2C 的相互作用

注: 图 a) 中黑色箭头指的为 SV2C (L4) 蛋白; 图 b) 中蓝色箭头指的是 EHC, 黑色箭头指的是 AHc; 图 c) 中黑色箭头指的是 Trx 蛋白; 图 d) 中红色箭头指的是细胞裂解液中的 SV2C。

Figure 3-5 Pull down experiment to detect the binding of BoNT/E and SV2C

Note: The black arrow in Figure a) points to SV2C (L4); Figure b) in the blue arrow refers to EHC and the black arrow refers to AHc; The black arrow in Figure c) points to Trx; The red arrow in Figure d) refers to SV2C in the cell lysate.

### 3.3.5 SV2糖基化和非糖基化对E型肉毒毒素结合的影响

为研究糖基化和非糖基化修饰的SV2和肉毒毒素结合的情况，实验利用HEK 293F细胞表达SV2A、SV2B、SV2C的L4蛋白。SV2A(L4)和SV2B(L4)蛋白在293细胞中没有明显的表达，通过优化条件，将SV2C(L4)和抗体Fc区域进行了融合，融合其后提高了表达量，并获得了重组蛋白，可用于ELISA和pull down实验，但SV2A(L4)-Fc和SV2B(L4)-Fc未纯化出。ELISA和pull down实验(见图3-6)中BoNT/E、EHc、BoNT/A和AHc与SV2C(L4)-Fc结合结果都是阴性，可能利用HEK 293F细胞表达的SV2C(L4)蛋白与体内天然蛋白的结构或蛋白构象不一致，进而造成在体外未表现出与肉毒毒素结合的能力。

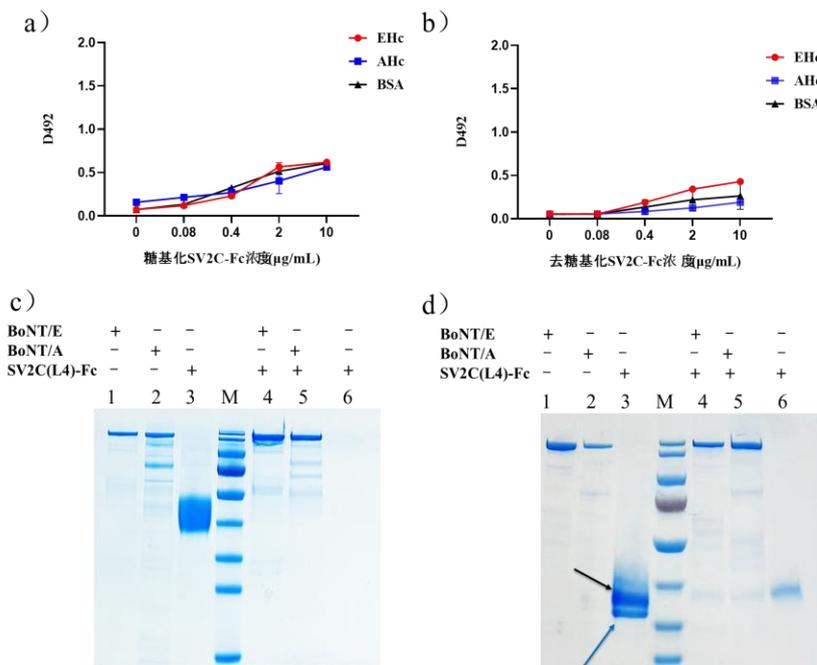


图 3-6 SV2C(L4)-Fc 与 BoNT/E 的结合

a) ELISA 检测糖基化 SV2C 与 AHc 及 EHc 的结合; b) ELISA 检测去糖基化 SV2C 与 AHc 及 EHc 的结合; c) pull down 检测 BoNT/A 和 BoNT/E 与糖基化 SV2C(L4)-Fc 的结合;

d) pull down 检测 BoNT/A 和 BoNT/E 与去糖基化 SV2C(L4)-Fc 的结合

注: 图 d) 中黑色箭头指的是去糖基化 SV2C(L4)-Fc; 蓝色箭头指的是 PNGF。

Figure 3-6 Binding of SV2C(L4)-Fc to BoNT/E

a) ELISA detection of glycosylated SV2C binding to AHc and EHc; b) Detection of the binding of glycosylated SV2C to AHc and EHc by ELISA; c) pull down detection of binding of BoNT/A and

BoNT/E to glycosylated SV2C (L4)-Fc; d) pull down detection of binding of BoNT/A and BoNT/E to deglycosylated SV2C-Fc

Note: The black arrow in Figure d) refers to deglycosylated SV2C(L4)-Fc; The blue arrow refers to PNGF.

### 3.3.6 E型肉毒毒素在不同细胞模型中的活性

Neuro-2a 是小鼠的脑神经瘤细胞，只表达 SV2 蛋白中的 C 亚型 (SV2C)，SH-SY5Y 是人神经母细胞瘤细胞，表达 SV2A 和 SV2C。我们发现 BoNT/E 可以切割 neuro-2a 细胞中的 SNAP25 蛋白，为进一步研究 BoNT/E 和 SV2C 的结合作用，进一步以 SH-SY5Y 细胞模型研究，分析比较在两种细胞模型中 BoNT/E 的切割效率，实验结果如图 3-7，并计算了  $EC_{50}$  (见表 3-6)。其中在 neuro-2a 细胞中单、双链 BoNT/E 的  $EC_{50}$  分别为 277.142 nM 和 94.816 nM，在 SH-SY5Y 细胞中单、双链 BoNT/E 的  $EC_{50}$  分别为 40.777 nM 和 18.177 nM。实验发现，在细胞水平双链切割 SNAP25 的效率约为单链的 2-3 倍，且单、双链 BoNT/E 在 SH-SY5Y 细胞中的切割效率要明显高于 neuro-2a。

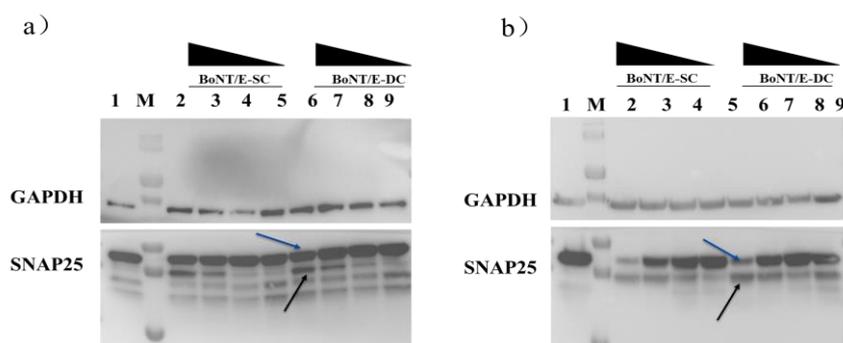


图 3-7 BoNT/E 切割神经细胞中 SNAP25 的 Western blot 鉴定图

a) BoNT/E 切割 neuro-2a 中的 SNAP25; b) BoNT/E 切割 SH-SY5Y 中的 SNAP25

注: 1: EL 300 nM; 2-5: BoNT/E-SC (300 nM, 60 nM, 12.5 nM, 2.5 nM); 6-9: BoNT/E-DC (300 nM, 60 nM, 12.5 nM, 2.5 nM); 蓝色箭头代表未切割的 SNAP25, 黑色箭头代表已被切割的 SNAP25; 展示 3 次独立实验中的一次。

Figure.3-7 Identification of SNAP25 in neurocytes cleaved by BoNT/E by Western blot

a) BoNT/E cleaved the SNAP25 in neuro-2a; b) BoNT/E cleaved the SNAP25 in SH-SY5Y

Note: 1: EL 300 nM; 2-5: BoNT/E-SC (300 nM, 60 nM, 12.5 nM, 2.5 nM); 6-9: BoNT/E-DC (300 nM, 60 nM, 12.5 nM, 2.5 nM); The blue arrow represents the uncut SNAP25, and the black arrow represents the cleaved SNAP25; Demonstrate one of three independent experiments.

表 3-6 BoNT/E 切割神经细胞中 SNAP25 的 EC<sub>50</sub> 值Table 3-6 The EC<sub>50</sub> calculation results of SNAP25 in nerve cells cleavage by BoNT/E

毒素分子	细胞类型	EC <sub>50</sub> (nM)
BoNT/E-SC	neuro-2a	277.142
BoNT/E-DC	neuro-2a	94.81
BoNT/E-SC	SH-SY5Y	40.777
BoNT/E-DC	SH-SY5Y	18.177

注: EC<sub>50</sub>:切割细胞 SNAP25 一半时的肉毒毒素的有效浓度。

### 3.4 分析及讨论

目前对 E 型肉毒毒素相关研究中, 在体内相关研究中, 糖基化 SV2A 和 SV2B 可能为其第二受体, 而在我们前期研究过程中发现 EHc 或 BoNT/E 在体外表现出和重组 SV2C (L4) 结合的能力。本实验就 SV2C 可能为 E 型肉毒毒素的受体进行了进一步的探究与验证。为了分析和比较 BoNT/E 与 SV2B 及 SV2C 的结合活性, 按照前期制备 SV2C (L4) 的方法表达并纯化 SV2B (L4) 蛋白。通过 ELISA 分析比较 BoNT/E 和 SV2B (L4) 与 SV2C (L4) 的结合差异, 结果显示 BoNT/E 与 SV2B (L4) 及 SV2C (L4) 都显现出相似的剂量依赖效应。

除此之外, 本实验利用蛋白 pull down 实验进一步验证, 结果表明 BoNT/E 可以捕获到 SV2C (L4), 且 SV2C (L4) 也可捕获到 EHc, 进一步通过 BoNT/E 捕获细胞中的 SV2C 来验证, 该实验结果初步表明 BoNT/E 能够捕获神经细胞中的 SV2C。在本研究中我们发现 E 型肉毒毒素可以和大肠杆菌系统中表达的 SV2 蛋白的结合, Weisemann 和 Gustafsson 等在 A 型肉毒毒素和受体 SV2 的研究中, 也利用大肠杆菌系统表达了 SV2 蛋白, 并且肉毒毒素和 SV2 蛋白表现出相应的结合活性<sup>[76, 78]</sup>。Pellett 等人以主要表达 SV2C 的 hiPSC 衍生运动神经元为细胞模型, 发现该细胞对 BoNT/E 高度敏感, 提出 SV2C 可能作为 E 型肉毒毒素的补偿受体<sup>[79]</sup>; 而 Fischer 等人也以只表达 SV2C 的 neuro-2a 为细胞模型, 通过膜片钳实验研究了 E 型肉毒毒素的跨膜易位过程, 并且检测到了相关信号<sup>[80]</sup>, 以上研究内容支持 SV2C 可作为 E 型肉毒毒素潜在受体的观点。除此之外, 我们也探究了糖基化修饰的 SV2C 与 E 型肉毒毒素的结合情况, 利用 HEK 293F 细胞进行表达 SV2A、SV2B 及 SV2C 的 L4 区, 但目的蛋白的表达量较低, 为提高目的蛋白的表达量, 我们将 SV2A、SV2B 及 SV2C 的 L4 区和抗体的 Fc 段进行融合

表达，最终制备出高纯度和浓度的 SV2C (L4)。之后通过 ELISA 和 pull down 实验研究糖基化修饰的 SV2C 和 E 型肉毒毒素的结合活性，但两个实验都表现出阴性的结果，推测可能是利用 HEK 293F 真核细胞表达的重组蛋白与天然蛋白的结构有一定的差异或因糖基化修饰方式不同，造成它们之间不结合。

SH-SY5Y 细胞表达 SV2A 和 SV2C，进一步我们以 SH-SY5Y 为模型研究 E 型肉毒毒素的细胞学活性，并和 neuro-2a 细胞进行了对比，发现 BoNT/E-SC 和 BoNT/E-DC 在 SH-SY5Y 中切割 SNAP25 的效率都要高于 neuro-2a 细胞，因此我们推测，SV2C 可在 SV2A 和 SV2B 不存在的情况下，起到和 E 型肉毒毒素结合的作用，但是可能结合的程度不如 SV2A 和 SV2B。

### 3.5 小结

(1) 利用大肠杆菌表达系统表达并纯化出高纯度的带有 Twin Strep 标签的 SV2B (L4) 蛋白，利用 HEK 293F 细胞表达并纯化出高纯度和浓度的 SV2C (L4)-Fc 蛋白。

(2) 在体外通过 ELISA 和 pull down 实验技术来分析 E 型肉毒毒素和 SV2C 的结合作用，实验结果表明 E 型肉毒毒素具有和原核系统表达的 SV2C (L4) 结合的能力，实验同时也分析了 E 型肉毒毒素和真核系统表达的 SV2C (L4) 的结合能力，但可能真核细胞表达的 SV2C 结构与神经细胞上存在的天然蛋白存在一定差异，体外实验未显示出二者的结合活性。

(3) E 型肉毒毒素可进入 SH-SY5Y 和 neuro-2a 细胞，切割胞浆中的 SNAP25，但其在 SH-SY5Y 中的切割效率更高。推测 E 型肉毒毒素与 SV2A 的结合能力比 SV2C 高或由于两个受体分子均起作用，因此会有更多的毒素分子结合并进入细胞内，但在 SV2A 和 SV2B 不存在的情况下，SV2C 可在一定程度上起到结合 E 型肉毒毒素的作用。

本章研究的结果总结见图 3-8。

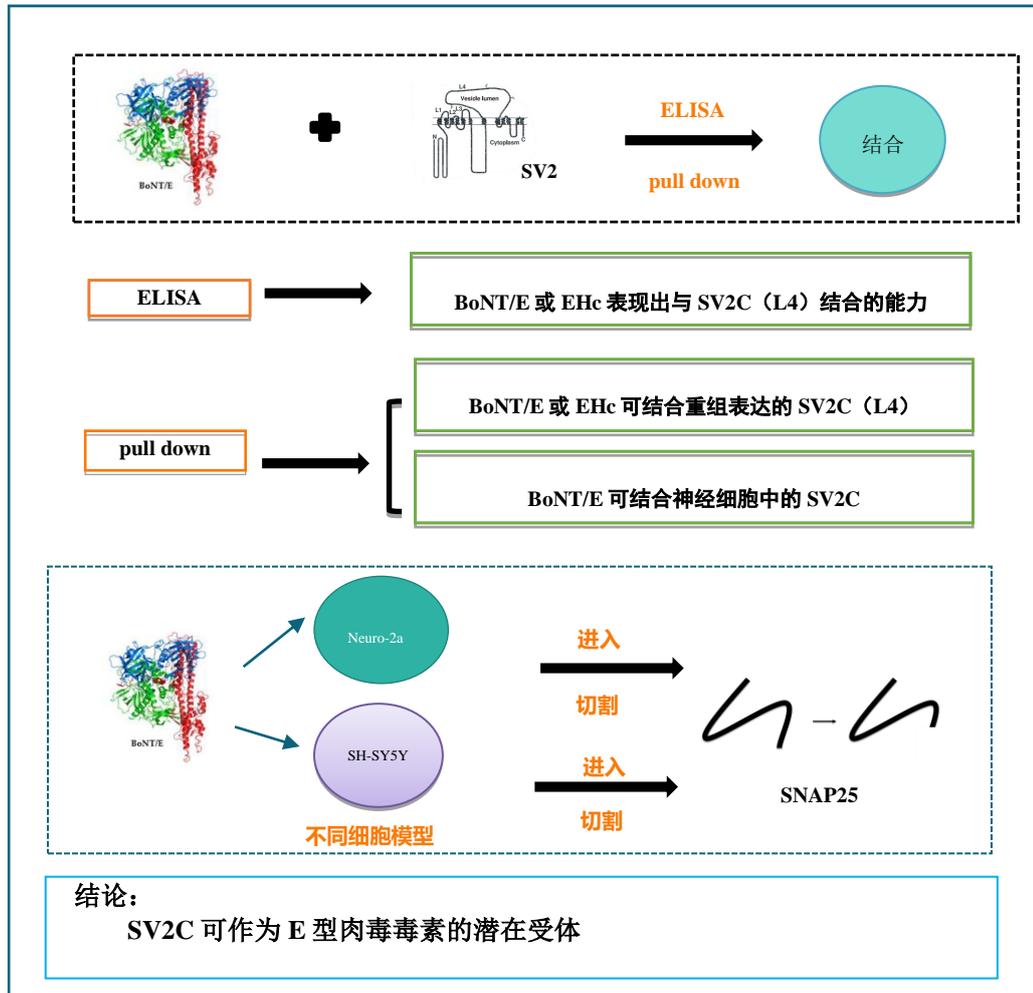


图 3-8 研究结果示意图

Figure 3-8 Schematic diagram of the results of the study

## 4 E型肉毒毒素激活环形区的作用研究

普遍认为，肉毒毒素分子以 150 kDa 的前体单链形式产生，之后在相关蛋白酶作用下激活环形区（activation loop）的两个半胱氨酸可形成二硫键<sup>[81]</sup>，此时肉毒毒素分子的神经毒性才被完全激活。肉毒毒素和细胞膜表面受体结合，通过受体介导的内吞作用进入细胞，之后细胞质中的 pH 值降低，使得 HN 介导 L 链的跨膜转移。细胞中的硫氧还蛋白还原酶-硫氧还蛋白系统使得轻链和重链之间的二硫键发生断裂，进而 L 可释放到细胞质中发挥蛋白酶活性。二硫键的断裂是肉毒毒素发挥神经毒性作用的必需环节，有研究表明通过抑制细胞质中硫氧还蛋白还原酶-硫氧还蛋白系统的活性，可降低肉毒毒素的神经毒性<sup>[30]</sup>。E 型肉毒毒素整体结构紧凑，在前期实验中发现无二硫键的单链 E 型肉毒毒素分子也有强的神经毒性，为进一步探究单双链分子的活性差异及二硫键的作用，本研究利用基因工程技术，对 E 型肉毒毒素的 activation loop 区进行突变，构建三种突变体分子。对 activation loop 区突变后的毒素分子进行验证，确定其单链分子的结构，之后在蛋白、细胞和小鼠体内研究其生物活性，并和未突变的 E 型肉毒毒素分子进行对比，进而确定各突变体分子的生物活性和毒力。

### 4.1 实验材料

#### 4.1.1 主要仪器

本章节实验所使用的主要仪器同 2.1.1 和 3.1.1。

#### 4.1.2 实验试剂

本章节实验所使用的主要仪器同 2.1.1 和 3.1.1。

#### 4.1.3 溶液的配制

本章节实验所使用的主要溶液同 2.1.3 和 3.1.3。

#### 4.1.4 实验动物

同 2.1.4。

#### 4.1.5 片段与引物的合成

本实验所需的引物均由北京六合华大公司合成。

### 4.2 实验方法

#### 4.2.1 质粒的构建

(1) 点突变的方法构建 BoNT/E 突变体质粒 BoNT/E-3K/3A

按照点突变实验方法设计特异性扩增引物，将 BoNT/E 的 activation loop 区中 413、419 和 423 位的赖氨酸 (K) 突变为丙氨酸 (A)，422 位的精氨酸 (R) 突变为丙氨酸 (A)，突变位点见图 4-1。



图 4-1 BoNT/E-3K/3A 的突变位点

Figure 4-1 Mutation site of BoNT/E-3K/3A

实验分为两部分，首先以实验室保存的 pTIG-Trx-EL-HN-His 为模板设计引物将 BoNT/E 的 419 和 423 位的赖氨酸 (K) 突变为丙氨酸 (A)，将 422 位的精氨酸 (R) 突变为丙氨酸 (A)，将构建好的质粒记作 EL-HN-2K/2A，之后以 EL-HN-2K/2A 为模板设计引物将 BoNT/E 的 413 位的赖氨酸 (K) 突变为丙氨酸 (A)，将构建好的质粒记作 EL-HN-3K/3A。之后将构建好的 EL-HN-3K/3A 片段两端分别引入酶切位点 *EcoRI* 和 *BamHI*，并连接到实验室保存的 pTIG-Trx-EHc-Twin Strep 载体上。

(2) 点突变的方法构建 BoNT/E 突变体质粒 BoNT/E-2C/2A

按照点突变的实验方法，将 BoNT/E 的 412 和 424 位的半胱氨酸 (C) 突变为丙氨酸 (A)，突变位点见图 4-2。



图 4-2 BoNT/E-2C/2A 的突变位点

Figure 4-2 Mutation site of BoNT/E-2C/2A

实验分为两步，第一步，以 pTIG-Trx-EL-HN-His 为模板，将 412 位的 C 突变为 A，构建好的质粒计为 EL-HN-C/A，之后以 EL-HN-C/A 为模板通过 PCR 将 424 位的 C 突变为 A，构建好的质粒计 EL-HN-2C/2A。之后将构建好的 EL-HN-2m 片段两端分别引入酶切位点 *EcoRI* 和 *BamHI*，用于连接到实验室保存的 pTIG-Trx-EHc-Twin Strep 载体上。

(3) 点突变的方法构建 BoNT/E 突变体质粒 BoNT/E-dM

以构建好的 EL-HN-3K/3A 为模板设计引物将先后将 BoNT/E 的 412 和 424 位的半胱氨酸 (C) 突变为丙氨酸 (A)，突变位点见图 4-3 并在 EL-HN-dM 片段两端分别引入酶切位点 *EcoRI* 和 *BamHI*，用于连接到实验室保存的 pTIG-Trx-EHc-Twin Strep 载体上。



图 4-3 BoNT/E-dM 的突变位点

Figure 4-3 Mutation site of BoNT/E-dM

点突变的实验方法如下：

1) PCR 扩增目的片段，PCR 体系如见表 4-1。

表 4-1 PCR 扩增体系

Table 4-1 PCR amplification system

试剂/DNA	质量/体积
模板	30 ng
2×Phanta Max Master Mix	25 μL
正向引物 (10 μm)	2 μL
反向引物 (10 μm)	2 μL
去离子水	补齐至 50 μL

PCR 扩增程序:

94°C	5 min	
94°C	10 s	} 30 个循环
Tm-5°C	15 s	
72°C	90 s	
72°C	10 min	
4°C	forever	

2) 将 5  $\mu$ L PCR 产物与 1  $\mu$ L 上样缓冲液混合, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定大小, 用凝胶成像系统拍摄电泳结果。取 10  $\mu$ L PCR 产物加 1  $\mu$ L *DpnI*, 37°C 酶切 1 h, 将酶切产物转化到 DMT 感受态细胞中, 之后挑阳性克隆送公司进行测序。

3) 提质粒, 之后通过双酶切, 将 EL-HN-3K/3A, EL-HN-2C/2A, EL-HN-dM 连接到 pTIG-Trx-EHc-Twin Strep 载体上。

4) 通过 *EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切鉴定 pTIG-Trx-BoNT/E-3K/3A-Twin Strep-tag pTIG-Trx-BoNT/E-2C/2A-Twin Strep-tag 及 pTIG-Trx-BoNT/E-dM-Twin Strep-tag 表达载体。

#### 4.2.2 目的蛋白的表达纯化

实验方法同 3.2.5。

#### 4.2.3 胰蛋白酶切割实验

实验方法同 2.2.3。

#### 4.2.4 蛋白水平测突变体分子的活性

实验方法同 2.2.4。

#### 4.2.5 细胞水平测突变体分子的活性

实验方法同 2.2.6。

#### 4.2.6 小鼠体内的 LD<sub>50</sub> 测定

实验方法同 2.2.7。

#### 4.2.7 统计学分析

实验方法同 2.2.11。

### 4.3 实验结果

#### 4.3.1 突变体质粒表达载体的构建

肉毒毒素经结合、内化、HN 介导 L 易位，之后在细胞质中硫氧还蛋白还原酶-硫氧还蛋白系统的作用下，L 和 HN 之间的二硫键断裂，L 链释放到细胞质中切割底物蛋白，进而发挥神经毒性作用。蛋白电泳结果显示，本实验室制备的 BoNT/E 为单链分子，但通过腹腔注射后表现出神经毒性，动物体内也可能有消化酶，为了排除体内酶的影响，确保 BoNT/E 是以单链结构的形式存在，通过制备相应的突变体分子进一步验证单双链分子的差异。本研究共制备 3 种突变体质粒，分别为：将 BoNT/E 的 413、419 和 423 位的赖氨酸（K）突变为丙氨酸（A），422 位的精氨酸（R）突变为丙氨酸（A），此突变是胰蛋白酶识别位点突变；将 BoNT/E 的 412 和 424 位的半胱氨酸（C）突变为丙氨酸（A），二硫键的形成主要是在酶作用下两个半胱氨酸残基形成二硫键，将此位点突变后，L 和 HN 之间将不能形成二硫键；第三个质粒为以上两个位点的双突变。

通过点突变的实验方法进行突变，首先构建突变质粒 EL-HN-3K/3A，EL-HN-2C/2A 和 EL-HN-dM，之后通过双酶切，将突变后的片段连接到 pTIG-Trx-EHc-Twin Strep-tag 载体上，转化、挑克隆、提质粒。通过 *EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切进行质粒鉴定，双酶切鉴定结果见图 4-4a-b。最后将质粒送公司测序，测序引物序列为 CTGACCTTCGGTGGTACCGAC，测序结果和目的序列完全一致。本实验成功构建了三个突变体毒素分子表达载体。

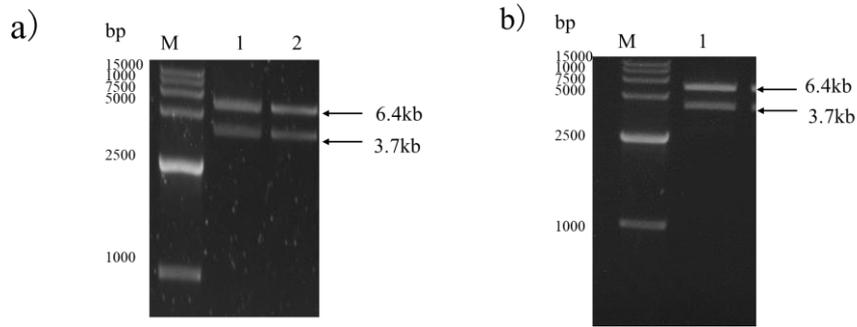


图 4-4 表达载体的双酶切鉴定 (*EcoRI* 和 *XhoI*)

a) BoNT/E-3K/3A 和 BoNT/E-2C/2A 双酶切鉴定; b) BoNT/E-dM 双酶切鉴定

注: 图 a) 中 M 泳道为 DNA 标志物; 1 号泳道为 BoNT/E-3K/3A; 2 号泳道为 BoNT/E-2C/2A

Figure 4-4 Double digestion identification of expression vectors (*EcoRI* and *XhoI*)

a) BoNT/E-3K/3A and BoNT/E-2C/2A double digestion identification; b) BoNT/E-dM double digestion identification

Note: M lanes in Figure a) are DNA markers; Lane 1 is BoNT/E-3K/3A; Lane 2 is BoNT/E-2C/2A

### 4.3.2 目的蛋白的表达纯化

将 pTIG-Trx-BoNT/E-3K/3A-Twin Strep-tag、pTIG-Trx-BoNT/E-2C/2A-Twin Strep-tag 及 pTIG-Trx-BoNT/E-dM-Twin Strep-tag 转化到 BL21 (DE3) 中, 经 0.2 mM IPTG, 16°C 诱导过夜, 之后通过 Twin Strep 纯化柱纯化, 成功纯化出 BoNT/E-3K/3A、BoNT/E-2C/2A 和 BoNT/E-dM, 三种目的蛋白 SDS-PAGE 鉴定结果见图 4-5。脱盐后, 三种目的蛋白的终浓度最高可达 0.7 mg/mL。蛋白电泳结果表明, 目的蛋白的纯度较高, 可满足后续实验的要求。

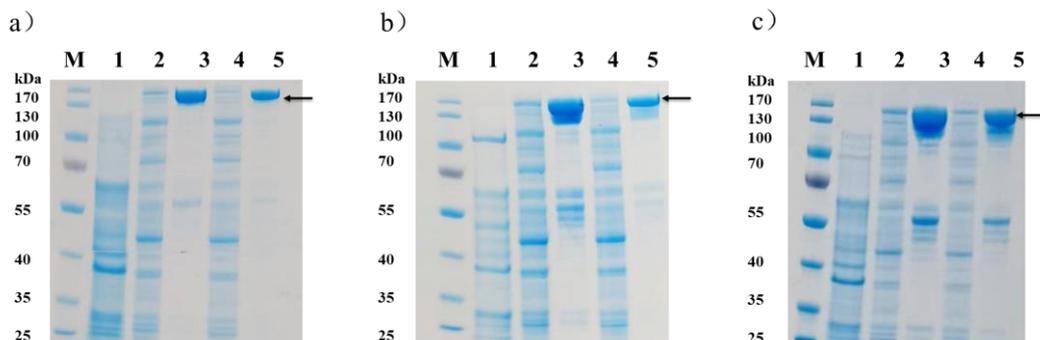


图 4-5 目的蛋白纯化后 SDS-PAGE 鉴定图

a) BoNT/E-3K/3A 的 SDS-PAGE 鉴定图; b) BoNT/E-2C/2A 的 SDS-PAGE 鉴定图; c)

## BoNT/E-dM 的 SDS-PAGE 鉴定图

注：图中各泳道分别为 M：蛋白 Marker；1：未诱导表达破碎上清；2：诱导表达破碎上清；3：未脱盐蛋白；4：上清穿过液；5：脱盐蛋白；黑色箭头指的是纯化出的目的蛋白。

Figure 4-5 SDS-PAGE identification diagram after purification of the protein of interest

a) SDS-PAGE identification diagram of BoNT/E-3K/3A; b) SDS-PAGE identification diagram of BoNT/E-2C/2A; c) SDS-PAGE identification diagram of BoNT/E-dM

Note: The lanes in the figure are M: protein Marker; 1: Uninduced expression disruption supernatant; 2: Induce expression disruption supernatant; 3: Unsalted protein; 4) Supernatant through the liquid; 5: Desalted protein; The black arrow refers to the purified protein of interest.

### 4.3.3 胰蛋白酶切割 BoNT/E 突变体蛋白

为进一步分析单链 BoNT/E 可能发挥作用的效应机制，利用点突变的方法将肉毒毒素的 activation loop 区进行了突变，并成功纯化出三种突变体分子。通过胰蛋白酶切割实验验证突变体蛋白的正确性，分别将 BoNT/E、BoNT/E-3K/3A、BoNT/E-2C/2A 及 BoNT/E-dM 与胰蛋白酶按照 100: 1 的质量比在 37°C 反应 1 h，之后在还原和非还原条件下进行蛋白电泳，检测胰蛋白酶对四种蛋白的切割作用，蛋白电泳结果见图 4-6，在胰蛋白酶的作用下，未突变的 BoNT/E 在还原电泳下形成一条 100 kDa 和一条 50 kDa 的条带，在非还原电泳下切割和未切割的 BoNT/E 仍以分子量为 150 kDa 的单链的形式存在（见图 4-6a 和图 4-6b 的 1 号泳道和 2 号泳道）。而对于 BoNT/E-3K/3A，通过对比图 4-6a 中的泳道 3 和泳道 4 以及图 4-6b 的泳道 3 和泳道 4 可以看出，在胰蛋白酶作用前后，BoNT/E-3K/3A 在还原和非还原的情况下绝大部分都以单链（150 kDa）的形式存在。同理，通过切割前后的还原和非还原电泳结果分析，BoNT/E-dM 也是以单链形式存在。对 BoNT/E-2C/2A 分子来说，将 activation loop 区的两个半胱氨酸进行突变后，在胰蛋白酶的作用下，L 和 HN 之间将断裂为两条链，通过图 4-6a 和图 4-6b 中的泳道 6 分析，BoNT/E-2C/2A 在胰蛋白酶作用下形成游离的两条链。通过以上分析，本研究制备的三种突变体分子表达成功，三种毒素分子突变体均是以单链形式存在，不能够形成双链的分子结构。

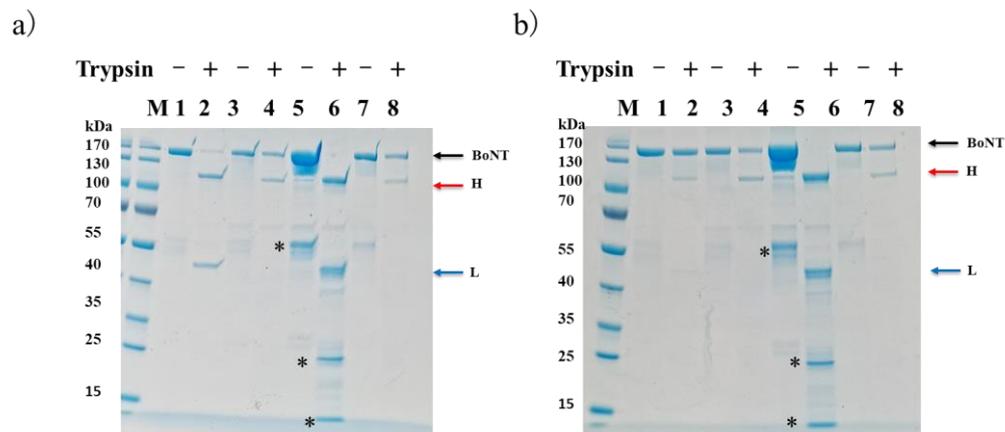


图 4-6 突变体分子的胰蛋白切割缺刻鉴定

a) 还原电泳下的缺刻鉴定; b) 非还原电泳下的缺刻鉴定

注: 图中 1-2 泳道为 BoNT/E, 3-4 泳道为 BoNT/E-3K/3A, 5-6 泳道为 BoNT/E-2C/2A, 7-8 泳道为 BoNT/E-dM; 黑的箭头指的是全长肉毒毒素; 红色箭头指的是重链; 蓝色箭头指的是轻链; 图中\*代表非特异条带。

Figure 4-6 Identification of pancreatic protein cleavage nicks in mutant molecules

a) Identification of nicks by reductive electrophoresis; b) Identification of nicks by non reductive electrophoresis

Note: In the figure, lanes 1-2 are BoNT/E, lanes 3-4 are BoNT/E-3K/3A, lanes 5-6 are BoNT/E-2C/2A, and lanes 7-8 are BoNT/E-dM. The black arrow refers to full-length botulinum neurotoxin; The red arrow refers to the heavy chain; The blue arrow refers to the light chain; \* in the figure represents non-specific bands.

#### 4.3.4 突变体分子在蛋白水平的活性

进一步通过分析各突变体分子在体外切割底物蛋白 SNAP25 的效率来评价其在蛋白水平的活性, 并与未突变的 BoNT/E 进行了比较。分别将不同浓度 (0-200 nM) 的突变体分子和 2  $\mu$ M 的 SNAP25 蛋白在 37 $^{\circ}$ C 共孵育 30 min, 5 $\times$ 电泳缓冲液终止反应, 各突变体蛋白分子切割 SNAP25 蛋白的电泳见图 4-7a-c, 之后通过灰度分析, 通过 SPSS 计算各分子切割 SNAP25 蛋白的 EC<sub>50</sub>, GraphPad Prism8.0 软件作图 (图 4-7d)。

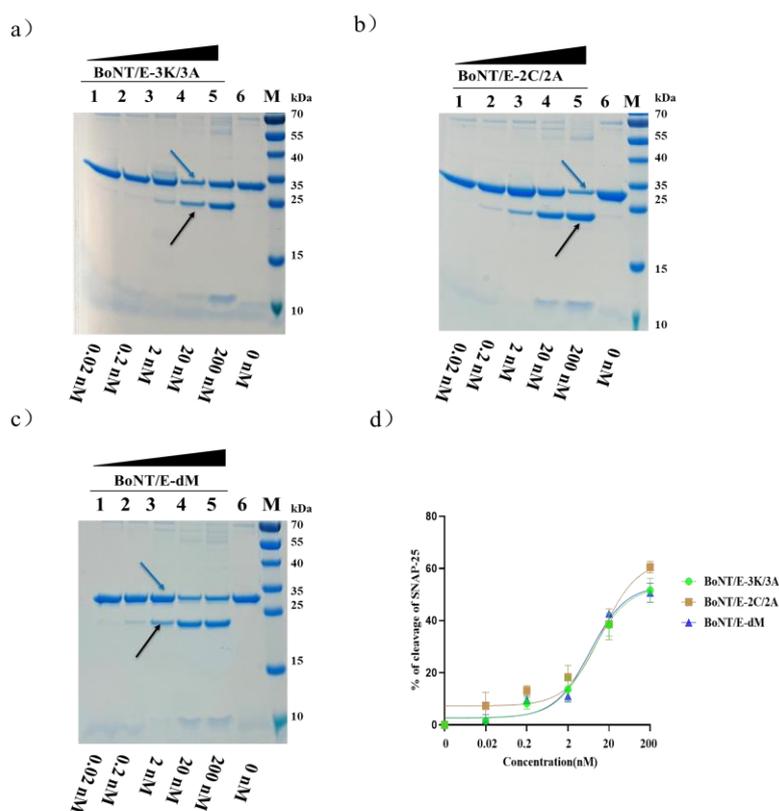


图 4-7 各蛋白分子在蛋白水平切割 SNAP25 结果图

a) BoNT/E-3K/3A 切割 SNAP25 的活性分析; b) BoNT/E-2C/2A 切割 SNAP25 的活性分析; c) BoNT/E-dM 切割 SNAP25 的活性分析; d) 突变体分子在体外切割 SNAP25 的效率分析

注: 以上实验中 SNAP25 的浓度为均为  $2 \mu\text{M}$ , 实验的总体积为  $50 \mu\text{L}$ ; 蓝色箭头指的是未被切割的 SNAP25, 黑色箭头指的是已被切割的 SNAP25。

Figure 4-7 Picture of the results of each protein molecule cleavage SNAP25 at the protein level  
a) Activity analysis of BoNT/E-3K/3A cleavage SNAP25; b) Activity analysis of BoNT/E-2C/2A cleavage SNAP25; c) Activity analysis of BoNT/E-dM cleavage SNAP25; d) Analysis of the efficiency of the mutant molecule in cleavage SNAP25

Note: The concentration of SNAP25 in the above experiment was  $2 \mu\text{M}$ , and the total volume of the experiment was  $50 \mu\text{L}$ . The blue arrow refers to the uncleaved SNAP25, while the black arrow refers to the cleaved SNAP25.

本实验将 BoNT/E-3K/3A、BoNT/E-2C/2A 及 BoNT/E-dM 和未突变的 BoNT/E 进行了对比, BoNT/E 切割 SNAP25 结果图见 4-8a-b。5 种蛋白体外切割  $2 \mu\text{M}$  的 SNAP25 的  $\text{EC}_{50}$  值见表 4-2, 单链 BoNT/E 的  $\text{EC}_{50}$  为  $4.447 \text{ nM}$ , 双链 BoNT/E 的  $\text{EC}_{50}$  为  $4.417 \text{ nM}$ , 单双链间的差异较小, 而 BoNT/E-3K/3A、

BoNT/E-2C/2A 及 BoNT/E-dM 的  $EC_{50}$  值分别为 72.628 nM、65.941 nM 和 73.256 nM，与未突变的 BoNT/E 相比，体外切割 SNAP25 的效率降低了约 15 倍。

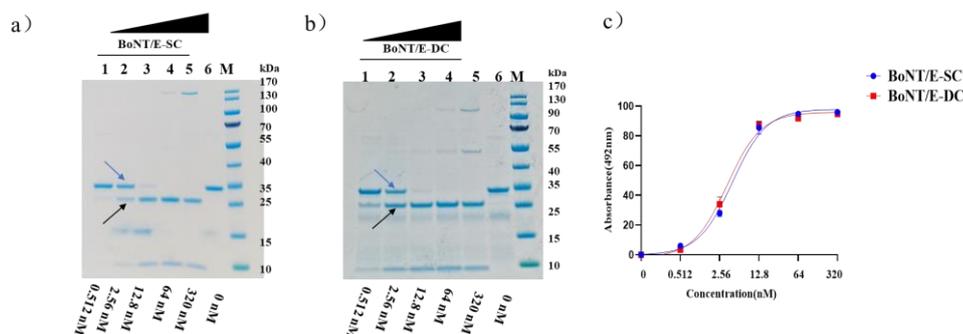


图 4-8 各蛋白分子在蛋白水平切割 SNAP25 结果图

a) BoNT/E-SC 切割 SNAP25 的活性分析；b) BoNT/E-DC 切割 SNAP25 的活性分析；c)

BoNT/E-SC 和 BoNT/E-DC 在体外切割 SNAP25 的效率分析

注：以上实验中 SNAP25 的浓度为均为 2  $\mu$ M，实验的总体积为 50  $\mu$ L；蓝色箭头指的是未被切割的 SNAP25，黑色箭头指的是已被切割的 SNAP25。

Figure 4-8 Picture of the results of each protein molecule cleavage SNAP25 at the protein level  
a) Activity analysis of BoNT/E-SC cleavage SNAP25; b) Activity analysis of BoNT/E-DC cleavage SNAP25; c) Analysis of the efficiency of BoNT/E-SC and BoNT/E-DC in vitro cleavage SNAP25;  
Note: The concentration of SNAP25 in the above experiment was 2  $\mu$ M, and the total volume of the experiment was 50  $\mu$ L. The blue arrow refers to the uncut SNAP25, while the black arrow refers to the cleaved SNAP25.

表 4-2 E 型肉毒毒素和突变体分子体外切割 SNAP25 的  $EC_{50}$  结果

Table 4-2 The results of  $EC_{50}$  of SNAP25 cleavage by BoNT/E and mutant molecules in vitro

肉毒毒素类型	结构特征	$EC_{50}$ (nM)
EL	L 结构域	0.18
EL-HN-SC	单链 L-HN	4.36
EL-HN-DC	双链 L-HN	5.61
BoNT/E-SC	单链	4.447
BoNT/E-DC	双链	4.145
BoNT/E-3K/3A	胰蛋白酶识别位点突变	72.628
BoNT/E-2C/2A	半胱氨酸突变	62.148
BoNT/E-dM	双突变	73.256

注： $EC_{50}$ : 切割 SNAP25 一半时肉毒毒素相关分子的有效浓度的有效浓度。

### 4.3.5 突变体分子在细胞水平的活性

以 SH-SY5Y 细胞为模型探究 E 型肉毒毒素 activation loop 突变体分子在细胞水平上的活性。待 SH-SY5Y 细胞生长到 70-80% 融合时，将细胞消化后，计算细胞的密度，按照  $1 \times 10^5$  cells/mL 的密度接种 24 孔板，继续培养约 48 h，之后分别将 BoNT/E-3K/3A、BoNT/E-2C/2A 及 BoNT/E-dM 和细胞共培养，最后通过 Western blot 检测细胞中 SNAP25 的切割情况，Western blot 实验结果见图 4-9（展示 3 实验中的一次结果）。实验结果显示，三种 activation loop 突变体分子在和 SH-SY5Y 共培养后，均可在细胞裂解物中检测到被切割的 SNAP25 蛋白。并通过灰度分析计算各分子切割细胞的 SNAP25 的  $EC_{50}$  值，SPSS 软件计算出 BoNT/E-3K/3A、BoNT/E-2C/2A 及 BoNT/E-dM 的  $EC_{50}$  值。同时也在 neuro-2a 细胞中分析和比较了 E 型肉毒毒素和三个突变体切割 SNAP25 的效率，Western blot 实验结果见图 4-10，各蛋白分子切割 SH-SY5Y 细胞 SNAP25 的  $EC_{50}$  值见表 4-3，切割 neuro-2a 细胞中 SNAP25 的  $EC_{50}$  值见表 4-4。其中 BoNT/E-3K/3A、BoNT/E-2C/2A 及 BoNT/E-dM 切割 SH-SY5Y 细胞的 SNAP25 的  $EC_{50}$  值分别为 206.686，200.420 及 257.223 nM，BoNT/E-SC 切割 SH-SY5Y 细胞 SNAP25 的  $EC_{50}$  为 40.177 nM，三个突变体分子切割效率与 BoNT/E-SC 相比约是 BoNT/E-SC 的 1/5，但在 neuro-2a 细胞中突变体分子和 BoNT/E-SC 的切割效率相当。

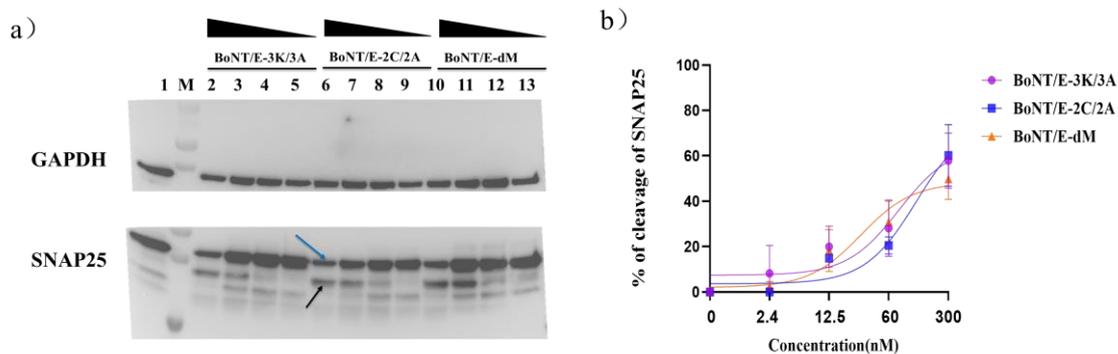


图 4-9 Activation loop 突变体切割 SH-SY5Y 中 SNAP25 的 Western blot 鉴定结果

a) 突变体分子切割 SH-SY5Y 细胞中的 SNAP25; b) 切割细胞 SNAP25 的定量分析

注: 1: EL 300 nM; 2-5: BoNT/E-3K/3A (300 nM, 60 nM, 12.5 nM, 2.5 nM); 6-9: BoNT/E-2C/2A (300 nM, 60 nM, 12.5 nM, 2.5 nM); 10-13: BoNT/E-dM (300 nM, 60 nM, 12.5 nM, 2.5 nM); 蓝色箭头代表未切割的 SNAP25, 黑色箭头代表已被切割的 SNAP25; 展示 3 次独立实验中的一次。

Figure 4-9 Western blot identification results of SNAP25 in SH-SY5Y cleaved by activation

loop mutant

a) Pictures of the mutants cleaving SNAP25 in SH-SY5Y cells; b) Quantitative analysis of SNAP25 in cleaved cells

Note: 1: EL 300 nM; 2-5: BoNT/E-3K/3A (300 nM, 60 nM, 12.5 nM, 2.5 nM); 6-9:BoNT/E-2C/2A (300 nM, 60 nM, 12.5 nM, 2.5 nM); 10-13: BoNT/E-dM (300 nM, 60 nM, 12.5 nM, 2.5 nM); The blue arrow represents the uncut SNAP25, and the black arrow represents the cut SNAP25;

Demonstrate one of three independent experiments

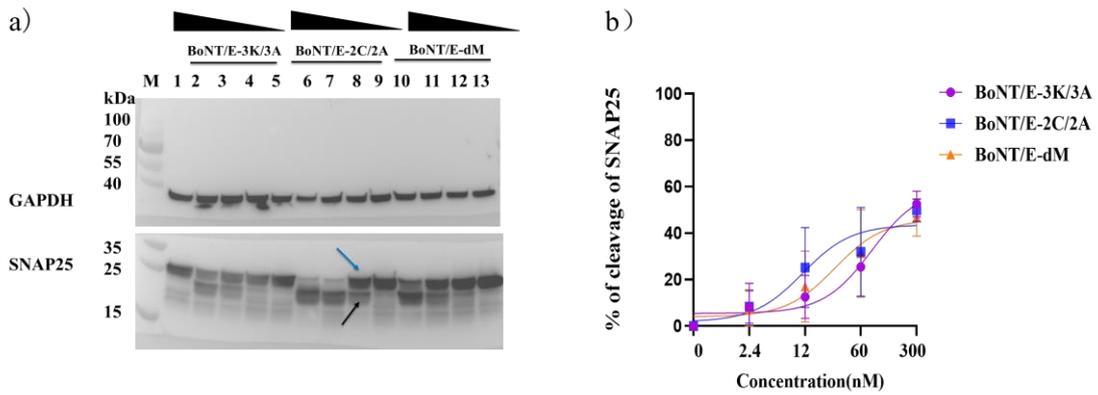


图 4-10 Activation loop 突变体切割 neuro-2a 中 SNAP25 的 Western blot 鉴定结果

a) Western blot 检测不同片段切割 SH-SY5Y 细胞中的 SNAP25; b) 切割细胞 SNAP25 的定量分析

注: 1: EL 300 nM; 2-5:BoNT/E-3K/3A (300 nM, 60 nM, 12.5 nM, 2.5 nM); 6-9: BoNT/E-2C/2A (300 nM, 60 nM, 12.5 nM, 2.5 nM); 10-13: BoNT/E-dM (300 nM, 60 nM, 12.5 nM, 2.5 nM); 蓝色箭头代表未切割的 SNAP25, 黑色箭头代表已被切割的 SNAP25; 展示 3 次独立实验中的一次。

Figure 4-10 Western blot identification results of SNAP25 in activation loop mutant cleaved neuro-2a

a) Western blot detection of SNAP25 in SH-SY5Y cells cleaved with different fragments; b) Quantitative Analysis of SNAP25 in cleaved cells

Note: 1: EL 300 nM; 2-5: BoNT/E-3K/3A (300 nM, 60 nM, 12.5 nM, 2.5 nM); 6-9: BoNT/E-2C/2A (300 nM, 60 nM, 12.5 nM, 2.5 nM); 10-13: BoNT/E-dM (300 nM, 60 nM, 12.5 nM, 2.5 nM); The blue arrow represents the uncut SNAP25, and the black arrow represents the cleaved SNAP25; Demonstrate one of three independent experiments.

表 4-3 E 型肉毒毒素和突变体分子切割 SH-SY5Y 细胞 SNAP25 的 EC<sub>50</sub> 值  
Table 4-3 EC<sub>50</sub> of SNAP25 in SH-SY5Y cells cleaved by botulinum neurotoxin serotype E and mutant molecules

肉毒毒素类型	结构特征	EC <sub>50</sub> (nM)
BoNT/E-SC	单链	40.777
BoNT/E-DC	双链	18.177
BoNT/E-3K/3A	胰蛋白酶识别位点突变	228.82
BoNT/E-2C/2A	半胱氨酸突变	249.27
BoNT/E-dM	双突变	301.64

注：EC<sub>50</sub>：切割细胞 SNAP25 一半时肉毒毒素分子的有效浓度

表 4-4 E 型肉毒毒素和突变体分子切割 neuro-2a 细胞 SNAP25 的 EC<sub>50</sub> 值  
Table 4-4 EC<sub>50</sub> of SNAP25 in neuro-2a cells cleaved by botulinum neurotoxin serotype E and mutant molecules

肉毒毒素类型	结构特征	EC <sub>50</sub> (nM)
BoNT/E-SC	单链	292.99
BoNT/E-DC	双链	131.09
BoNT/E-3K/3A	胰蛋白酶识别位点突变	305.80
BoNT/E-2C/2A	半胱氨酸突变	289.634
BoNT/E-dM	双突变	358.512

注：EC<sub>50</sub>：切割细胞 SNAP25 一半时肉毒毒素分子的有效浓度

#### 4.3.6 突变体分子在小鼠体内的活性

细胞和蛋白水平的实验表明 3 种 activation loop 区突变的分子都可以在蛋白水平和细胞水平切割底物蛋白 SNAP25，进一步测定了突变体分子在小鼠体内的 LD<sub>50</sub> 以评价其在小鼠体内的活性，并和未突变的 BoNT/E 进行了对比。用生理盐水将蛋白稀释成不同浓度，之后腹腔注射到小鼠体内。在注射蛋白后，小鼠出现肉毒毒素中毒症状，表现为：呼吸急促、及四肢无力甚至瘫痪等，统计小鼠的存活数，通过 SPSS 计算 LD<sub>50</sub>，实验结果见表 4-5。其中 BoNT/E-3K/3A 的 LD<sub>50</sub> 为 375.67 ng，BoNT/E-2C/2A 的 LD<sub>50</sub> 为 259.62 ng，BoNT/E-dM 的 LD<sub>50</sub> 为 1.45 μg。而未突变的单链 BoNT/E 的 LD<sub>50</sub> 约为 204.01 ng，双链 BoNT/E 的 LD<sub>50</sub> 约为 0.71 ng，单双链差异明显，双链分子的毒力约为单链的 287 倍。通过测定小鼠的半数致死剂量，发现 activation loop 区突变的三种分子，其神经毒力与未突变的单链 BoNT/E 的相比有所降低，但是仍表现出较强的肉毒毒素神经毒力。

表 4-5 E 型肉毒毒素和其突变体的神经毒力

Table 4-5 The results of neurovirulence of botulinum neurotoxin serotype E and its mutant

molecules		
肉毒毒素类型	结构特征	LD <sub>50</sub> (ng/只, 平均数±标准差)
BoNT/E-SC	单链	204.01±97.00
BoNT/E-DC	双链	0.71±0.41
BoNT/E-3K/3A	胰蛋白酶识别位点突变	375.67±164.85
BoNT/E-2C/2A	半胱氨酸突变	259.62±122.02
BoNT/E-dM	双突变	1454.71±506.11

注: LD<sub>50</sub>: 半数致死量 (median lethal dose)

#### 4.4 讨论

肉毒毒素通常被认为是以较低毒性的单链前体分子产生, 之后在细菌体内或体外酶的作用下<sup>[57, 82]</sup>, 轻链和重链之间形成二硫键, 此时肉毒毒素被激活, 毒性至少提高 100 倍<sup>[83]</sup>。Pellett 等制备了 A 型肉毒毒素 L 链酶活性突变体蛋白并测定了小鼠的半数致死剂量, 轻链突变体的双链分子的小鼠 LD<sub>50</sub> 为 1.12 μg/只, 单链分子的 LD<sub>50</sub> 为 8.9 μg/只<sup>[84]</sup>; 段丽娟等测定了未激活和激活的 E 型肉毒毒素的神经毒力, 胰酶激活后 E 型肉毒毒素的毒力是激活前的 1000 倍<sup>[85]</sup>。单链肉毒毒素分子毒力和双链分子的毒力存在差异, 但单链肉毒毒素似乎仍存在一定的毒力, 然而目前尚未有关于单链肉毒毒素产生中毒机制的研究。

根据经典的作用机制, 肉毒毒素内化进入神经细胞后, L 链在 HN 的作用下跨膜易位, 之后二硫键在细胞质中的还原系统下断裂, L 链被释放到细胞质中, 进而切割底物蛋白, 发挥神经麻痹作用。单链肉毒毒素不具有二硫键, 按照目前肉毒毒素的作用机制理论, 意味着其不能释放轻链进入胞液, 故不能切割 SNAREs, 继而不能够发挥毒性作用。本课题组前期研究发现 E 型肉毒毒素激活成双链后其神经毒力较单链 BoNT/E 提高了约 287 倍, 这与目前对肉毒毒素相关认识的研究结果相符。但在本研究中未被激活的单链 E 型肉毒毒素在小鼠体内的 LD<sub>50</sub> 为 204 ng, 也具有较强的神经毒力, 并且在细胞和蛋白水平都能够切割底物蛋白 SNAP25。我们推测单链结构的 E 型肉毒毒素进入神经细胞细胞质和动物体内的原因, 可能存在两种情况: 一种是, 单链 E 型肉毒毒素在细胞内或动物体内的内源性蛋白酶作用下<sup>[18]</sup>, 可能有部分单链肉毒毒素分子被缺刻而形成双链, 继而产生了有活性的双链毒素分子, 这部分双链分子通过经典的作用机制发挥了毒性作用; 另一种是, 如果不存在这种内源性蛋白酶作用产生双链分子的

现象，一定存在其它不依赖双链结构而进入神经细胞的作用机制或通路。这种通路能够使全长毒素分子或轻链连同 HN 结构域一同进入神经细胞的胞质中，进而产生酶活性。如果存在这种机制，单链毒素分子产生的体内活性较双链分子弱些是正常现象，因为它是非主流通路或是替代通路，仅有部分分子进入胞质或进入胞内的分子活性相对于单独的轻链其酶活性较弱。

为进一步探究第二种情况的可能性及其分子机制，首先需要排除第一种情况，确保进入细胞或体内的是单链毒素分子，因此，本研究利用基因工程技术，构建并表达了 E 型肉毒毒素 activation loop 区三种突变体分子。在体外胰蛋白酶作用下，两种突变体蛋白（BoNT/E-3K/3A 和 BoNT/E-dM）仍然以单链的形式存在，另外一种突变体（BoNT/E-2C/2A）则被缺刻为单独的轻链和重链（两者间无二硫键）。这个结果表明，在注射动物体内或和细胞共培养时，即使存在外源蛋白酶作用，BoNT/E-3K/3A 和 BoNT/E-dM 仍然只能以单链肉毒毒素的形式存在并进入细胞，BoNT/E-2C/2A 也只能以全长分子结构或无毒力的毒素分子（单独的轻链）进入细胞中。小鼠体内实验结果显示，与双链 BoNT/E 相比，单链及突变体蛋白的毒力已大大降低，但其仍表现出较强的毒力；与单链 BoNT/E 相比，三种突变体分子的毒力略有降低，结合蛋白水平和细胞水平的实验，三种突变体蛋白均能够在体外切割底物蛋白 SNAP25，尤其是可以进入神经细胞，同时与未突变的 BoNT/E 相比，其切割效率有所下降。综合体内和体外实验结果，发现体内和体外实验结果相符，且在不同水平各毒素分子的活性效率表现出一定的相关性。因此，可以推断单链肉毒毒素可进入细胞内，发挥毒性效应。本研究结果与我们第二种推断相符，即毒素全长分子存在不依赖双链结构而进入神经细胞的作用机制或通路。此外，本课题组也正在开展更加精准的实验来进一步验证这种假说或机制，例如在体内或细胞内观察全长毒素分子的轻链和重链的定位。

本研究构造的半胱氨酸突变体肉毒毒素分子和 Zuverink 等人的研究结果不同，破伤风毒素和肉毒毒素同属于梭菌毒素，两者具有相似的结构，Zuverink 等对破伤风 activation loop 区的两个半胱氨酸进行了突变，该破伤风毒素突变体不能够形成双链分子，细胞学实验证明其不能够切割底物，提示其 L 链或全长毒素分子不能易位进入细胞质中<sup>[86]</sup>。Fischer 等人在 A 型肉毒毒素的研究中，同时也发现 L-HN 分子的单链形式或者在还原状态下，它也不能够切割 neuro-2a 细胞 SNAP25 底物蛋白<sup>[23]</sup>。这两个文献研究结果验证了毒素双链分子的结构在释放轻链进入细胞质中具有重要的作用，是必要的结构特征。在本研究中 activation loop 区突变后的 E 型肉毒毒素分子在体内外的活性明显低于双链结构分子，说明双链的形成对其发挥神经毒性作用非常重要，但突变体活性只比正常单链分子略低，单链结构的 E 型肉毒毒素仍具有强的细胞学和体内毒性。本研究中发现

的这些现象和研究结果，有力地验证了上面的第二种假设。我们推测突变体单链肉毒毒素分子在完成与神经细胞的结合通过内吞作用进入膜内后，毒素分子可能通过不依赖于双链断裂释放轻链的作用机制而进入细胞质内发挥毒性作用。这可能是肉毒毒素分子进入神经细胞的一个新通路，也为深入研究全长肉毒毒素分子的作用机制提供了重要的研究基础和新的方向。对于此观点，本课题组也需要更深入的研究去证实。

#### 4.5 小结

(1) 构建了 BoNT/E 的 activation loop 区突变体分子，成功通过原核系统表达并纯化出 BoNT/E-3K/3A、BoNT/E-2C/2A 和 BoNT/E-dM 蛋白。

(2) 与 BoNT/E-SC 相比，BoNT/E-3K/3A、BoNT/E-2C/2A 和 BoNT/E-dM 在蛋白和细胞中切割 SNAP25 的效率及在小鼠体内的毒力 LD<sub>50</sub> 降低，但仍表现出较强的生物学活性。

(3) 无缺刻位点、无二硫键氨基酸的 E 型肉毒毒素单链分子也具有较强的细胞学活性，发挥着神经毒性效应，故单链 E 型肉毒毒素和其非双链改构的突变体分子可通过不依赖双链结构的机制进入神经细胞发挥作用。

本章实验小结示意图见图 4-11。

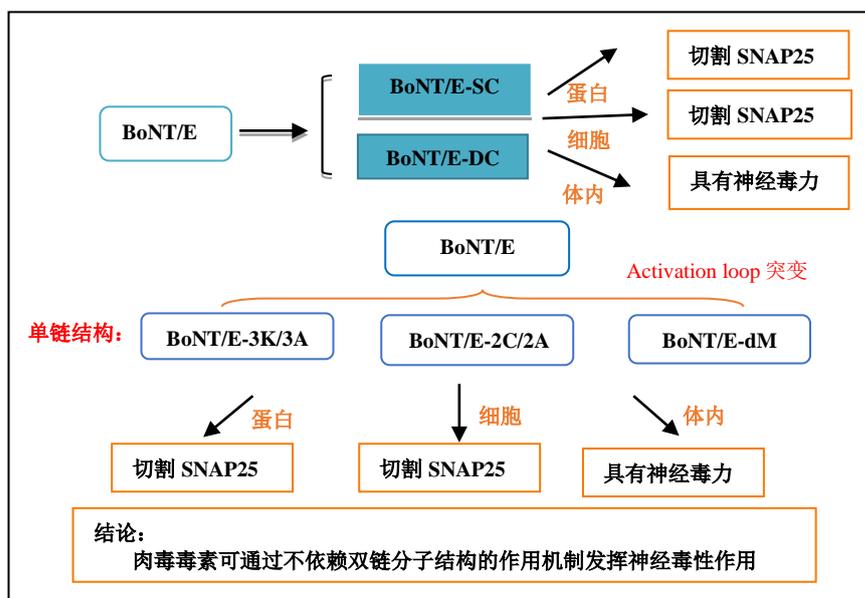


图 4-11 研究结果示意图

Figure 4-11 Schematic diagram of the results of the study

## 5 结论与展望

### 5.1 结论

(1) EL-HN 在体内和体外均具有强的生物活性，HN 可介导肉毒毒素与神经细胞潜在受体 SV2C 的结合，EL-HN 可作为一种潜在的药物筛选模型分子。

(2) 首次发现 E 型肉毒毒素在体外可与 SV2C 蛋白结合，能进入仅表达 SV2C 的 neuro-2a 神经细胞并切割底物蛋白 SNAP25。在无 SV2A 和 SV2B 条件下，E 型肉毒毒素可能通过补偿受体 SV2C 与神经细胞结合，从而进入细胞。

(3) 单链结构的 E 型肉毒毒素分子具有较强的体内外活性，可发挥神经毒性效应，表明单链 E 型肉毒毒素可通过不依赖双链结构的机制进入神经细胞发挥作用。

### 5.2 展望

本实验室制备的 EL-HN 分子是 A、B、E 和 F 型 4 种血清型 L-HN 分子中毒力和活性最强的分子，提示 E 型肉毒毒素是 4 种毒素中最特殊的一个，这可能与 E 型肉毒毒素更加紧凑的结构有关。EL-HN 可代替全长肉毒毒素作为研究肉毒毒素跨膜效应的分子；EL-HN 也可作为一种用于筛选针对 E 型肉毒毒素 L 链抗体的分子。

本研究首次提出 SV2C 可作为 E 型肉毒毒素潜在的补偿受体，介导毒素分子与神经细胞的结合，从而使得毒素分子可切割胞浆中的底物蛋白。为进一步确认 SV2C 为 E 型肉毒毒素的受体，本实验室正在进行 SV2C 与 BoNT/E 复合物晶体结构研究以及构建敲除 SV2C 的神经细胞等相关研究。

本研究发现虽然双链结构和二硫键在肉毒中毒过程中起着重要作用，但部分单链结构分子可通过不依赖双链二硫键的作用方式进入细胞并产生效应，提示这是肉毒毒素发挥毒性效应的新机制，我们将通过活体成像进一步验证该现象或机制。

目前对于肉毒毒素的完整的作用机制仍不清楚，其分子效应和作用机制值得深入研究，我们的研究结果为深入研究全长毒素分子在细胞中产生细胞学活性和神经毒性效应的作用机制提供了重要的研究基础和数据。

## 参考文献

- [1] Münchau A, Bhatia K P. Uses of botulinum toxin injection in medicine today [J]. *British Medical Journal*, 2000, 320(7228): 161-165.
- [2] 李珍, 徐青, 余云舟. E型肉毒神经毒素重组 Hc-C亚单位疫苗免疫原性研究[J]. *军事医学*, 2019, 43(5):6.
- [3] Zhang S, Masuyer G, Zhang J, et al. Identification and characterization of a novel botulinum neurotoxin [J]. *Nature communications*, 2017, 8: 14130.
- [4] Hill K K, Smith T J, Helma C H, et al. Genetic diversity among botulinum neurotoxin-producing clostridial strains [J]. *Journal of bacteriology*, 2007, 189(3): 818-832.
- [5] Peck M W, Smith T J, Anniballi F, et al. Historical perspectives and guidelines for botulinum neurotoxin subtype nomenclature [J]. *Toxins*, 2017, 9(1):38.
- [6] Rao A K, Sobel J, Chatham-Stephens K, et al. Clinical guidelines for diagnosis and treatment of botulism, 2021 [J]. *Morbidity and mortality weekly report recommendations and reports*, 2021, 70(2): 1-30.
- [7] Lim E C, Seet R C. Use of botulinum toxin in the neurology clinic [J]. *Nature reviews neurology*, 2010, 6(11): 624-636.
- [8] Dong M, Stenmark P. The structure and classification of botulinum toxins [J]. *Handbook of experimental pharmacology*, 2021, 263: 11-33.
- [9] Hill K K, Xie G, Foley B T, et al. Genetic diversity within the botulinum neurotoxin-producing bacteria and their neurotoxins [J]. *Toxicon : official journal of the international society on toxinology*, 2015, 107(Pt A): 2-8.
- [10] Nuemket N, Tanaka Y, Tsukamoto K, et al. Preliminary X-ray crystallographic study of the receptor-binding domain of the D/C mosaic neurotoxin from clostridium botulinum [J]. *Acta crystallographica Section F, structural biology and crystallization communications*, 2010, 66(Pt 5): 608-610.
- [11] Simpson L L. The binding fragment from tetanus toxin antagonizes the neuromuscular blocking actions of botulinum toxin [J]. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 1984, 229(1): 182-187.
- [12] Simpson L L. Botulinum toxin and tetanus toxin recognize similar membrane determinants [J]. *Brain research*, 1984, 305(1): 177-180.
- [13] Blasi J, Egea G, Castiella M J, et al. Binding of botulinum neurotoxin to pure cholinergic nerve terminals isolated from the electric organ of Torpedo [J]. *Journal of neural transmission General section*, 1992, 90(2): 87-102.
- [14] Montecucco C. How do tetanus and botulinum toxins bind to neuronal membranes? [J]. *Trends in biochemical sciences*, 1986, 11(8): 314-317.
- [15] Dong M, Yeh F, Tepp W H, et al. SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin A [J]. *Science*, 2006, 312(5773): 592-596.
- [16] Mahrhold S, Rummel A, Bigalke H, et al. The synaptic vesicle protein 2C mediates the uptake of botulinum neurotoxin A into phrenic nerves [J]. *Federation of European Biochemical*

- Societies letters, 2006, 580(8): 2011-2014.
- [17] Dong M, Liu H, Tepp W H, et al. Glycosylated SV2A and SV2B mediate the entry of botulinum neurotoxin E into neurons [J]. *Molecular biology of the cell*, 2008, 19(12): 5226-37.
- [18] Cai S, Kumar R, Singh B R. Clostridial neurotoxins: structure, function and implications to other bacterial toxins [J]. *Microorganisms*, 2021, 9(11):2206.
- [19] Jacky B P, Garay P E, Dupuy J, et al. Identification of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) as a protein receptor for botulinum neurotoxin serotype A (BoNT/A) [J]. *PLoS pathogens*, 2013, 9(5): e1003369.
- [20] Davies J R, Liu S M, Acharya K R. Variations in the botulinum neurotoxin binding domain and the potential for novel therapeutics [J]. *Toxins*, 2018, 10(10):421.
- [21] Gu S, Rumpel S, Zhou J, et al. Botulinum neurotoxin is shielded by NTNHA in an interlocked complex [J]. *Science*, 2012, 335(6071): 977-981.
- [22] Maruta T, Dolimbek B Z, Aoki K R, et al. Mapping of the synaptosome-binding regions on the heavy chain of botulinum neurotoxin A by synthetic overlapping peptides encompassing the entire chain [J]. *The protein journal*, 2004, 23(8): 539-552.
- [23] Fischer A, Mushrush D J, Lacy D B, et al. Botulinum neurotoxin devoid of receptor binding domain translocates active protease [J]. *PLoS pathogens*, 2008, 4(12): e1000245.
- [24] Fischer A, Sambashivan S, Brunger A T, et al. Beltless translocation domain of botulinum neurotoxin A embodies a minimum ion-conductive channel [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2012, 287(3): 1657-1661.
- [25] Khounlo R, Kim J, Yin L, et al. Botulinum toxins A and E inflict dynamic destabilization on t-SNARE to impair SNARE assembly and membrane fusion [J]. *Structure*, 2017, 25(11): 1679-1686.e5.
- [26] Mechaly A, Diamant E, Alcalay R, et al. Highly specific monoclonal antibody targeting the botulinum neurotoxin type E exposed SNAP-25 neopeptide [J]. *Antibodies*, 2022, 11(1):21.
- [27] Dong M, Masuyer G, Stenmark P. Botulinum and tetanus neurotoxins [J]. *Annual review of biochemistry*, 2019, 88: 811-837.
- [28] 周建营, 施玉樑. 肉毒神经毒素受体的研究进展 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 33(2): 116-121.
- [29] Pirazzini M, Azarnia Tehran D, Zanetti G, et al. The thioredoxin reductase--Thioredoxin redox system cleaves the interchain disulphide bond of botulinum neurotoxins on the cytosolic surface of synaptic vesicles [J]. *Toxicon*, 2015, 107(Pt A): 32-36.
- [30] Pirazzini M, Azarnia Tehran D, Zanetti G, et al. Thioredoxin and its reductase are present on synaptic vesicles, and their inhibition prevents the paralysis induced by botulinum neurotoxins [J]. *Cell reports*, 2014, 8(6): 1870-1878.
- [31] Pirazzini M, Rossetto O, Eleopra R, et al. Botulinum neurotoxins: biology, pharmacology, and toxicology [J]. *Pharmacological reviews*, 2017, 69(2): 200-235.
- [32] Scott A B. Botulinum toxin injection into extraocular muscles as an alternative to strabismus surgery [J]. *Journal of pediatric ophthalmology and strabismus*, 1980, 17(1): 21-25.
- [33] Lew M F. Review of the FDA-approved uses of botulinum toxins, including data suggesting efficacy in pain reduction [J]. *The Clinical journal of pain*, 2002, 18(6 Suppl): 142-146.
- [34] Aurora S K, Dodick D W, Turkel C C, et al. OnabotulinumtoxinA for treatment of chronic

- migraine: results from the double-blind, randomized, placebo-controlled phase of the PREEMPT 1 trial [J]. *Cephalalgia*, 2010, 30(7): 793-803.
- [35] Hsieh L F, Wu C W, Chou C C, et al. Effects of botulinum toxin landmark-guided intra-articular injection in subjects with knee osteoarthritis [J]. *Pm & R the journal of injury function & rehabilitation*, 2016, 8(12): 1127-1135.
- [36] Jhang J F, Kuo H C. Botulinum toxin A and lower urinary tract dysfunction: pathophysiology and mechanisms of action [J]. *Toxins*, 2016, 8(4): 120.
- [37] Ziade M, Domergue S, Batifol D, et al. Use of botulinum toxin type A to improve treatment of facial wounds: a prospective randomised study [J]. *Plast reconstr aesthet surg*, 2013, 66(2): 209-214.
- [38] Pickett A, Perrow K. Towards new uses of botulinum toxin as a novel therapeutic tool [J]. *Toxins*, 2011, 3(1): 63-81.
- [39] Tao L, Peng L, Berntsson R P, et al. Engineered botulinum neurotoxin B with improved efficacy for targeting human receptors [J]. *Nature communications*, 2017, 8(1): 53.
- [40] Miyashita S I, Zhang J, Zhang S, et al. Delivery of single-domain antibodies into neurons using a chimeric toxin-based platform is therapeutic in mouse models of botulism [J]. *Science translational medicine*, 2021, 13(575): eaaz4197.
- [41] Gunnison J B, Cummings J R, Meyer K F. Clostridium botulinum type E [J]. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, 1936, 35(2): 278-280.
- [42] 王成怀, 孟筱琦. 中国的 E 型肉毒中毒及其病原菌的特点[J]. *微生物学免疫学进展*, 1998, 26(4):4.
- [43] Fan Y, Garcia-Rodriguez C, Lou J, et al. A three monoclonal antibody combination potently neutralizes multiple botulinum neurotoxin serotype F subtypes [J]. *PloS one*, 2017, 12(3): e0174187.
- [44] Yoelin S G, Dhawan S S, Vitarella D, et al. Safety and efficacy of EB-001, a novel type E botulinum toxin, in subjects with glabellar frown lines: results of a phase 2, randomized, placebo-controlled, ascending-dose study [J]. *Plastic and reconstructive surgery*, 2018, 142(6): 847e-855e.
- [45] Pons L, Vilain C, Volteau M, et al. Safety and pharmacodynamics of a novel recombinant botulinum toxin E (rBoNT-E): results of a phase 1 study in healthy male subjects compared with abobotulinumtoxinA (Dysport®) [J]. *Journal of the neurological sciences*, 2019, 407: 116516.
- [46] Nowakowska M B, Selby K, Przykopanski A, et al. Construction and validation of safe Clostridium botulinum Group II surrogate strain producing inactive botulinum neurotoxin type E toxoid [J]. *Scientific reports*, 2022, 12(1): 1790.
- [47] Shi D Y, Liu F J, Li Z Y, et al. Development and evaluation of a tetravalent botulinum vaccine [J]. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 2022, 18(5): 2048621.
- [48] Lacy D B, Tepp W, Cohen A C, et al. Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity [J]. *Nature structural biology*, 1998, 5(10): 898-902.
- [49] Swaminathan S, Eswaramoorthy S. Structural analysis of the catalytic and binding sites of clostridium botulinum neurotoxin B [J]. *Nature structural biology*, 2000, 7(8): 693-699.
- [50] Kumaran D, Eswaramoorthy S, Furey W, et al. Domain organization in clostridium botulinum

- neurotoxin type E is unique: its implication in faster translocation [J]. *Journal of molecular biology*, 2009, 386(1): 233-245.
- [51] Keller J E, Cai F, Neale E A. Uptake of botulinum neurotoxin into cultured neurons [J]. *Biochemistry*, 2004, 43(2): 526-532.
- [52] Schnaar R L. Gangliosides of the vertebrate nervous system [J]. *Journal of molecular biology*, 2016, 428(16): 3325-3336.
- [53] Benson M A, Fu Z, Kim J J, et al. Unique ganglioside recognition strategies for clostridial neurotoxins [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2011, 286(39): 34015-34022.
- [54] Bajjalieh S M, Peterson K, Linial M, et al. Brain contains two forms of synaptic vesicle protein 2 [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, 90(6): 2150-2154.
- [55] Peng L, Tepp W H, Johnson E A, et al. Botulinum neurotoxin D uses synaptic vesicle protein SV2 and gangliosides as receptors [J]. *PLoS pathogens*, 2011, 7(3): e1002008.
- [56] Lalaurie C J, Splevins A, Barata T S, et al. Elucidation of critical pH-dependent structural changes in Botulinum Neurotoxin E [J]. *Journal of structural biology*, 2022, 214(3): 107876.
- [57] Aoki K R, Guyer B. Botulinum toxin type A and other botulinum toxin serotypes: a comparative review of biochemical and pharmacological actions [J]. *European journal of neurology*, 2001, 8 Suppl 5: 21-29.
- [58] Gregory K S, Newell A R, Mojanaga O O, et al. Crystal Structures of the clostridium botulinum neurotoxin A6 cell binding domain alone and in complex with GD1a reveal significant conformational flexibility [J]. *International journal of molecular sciences*, 2022, 23(17):129.
- [59] Baldwin M R, Tepp W H, Przedpelski A, et al. Subunit vaccine against the seven serotypes of botulism [J]. *Infection and immunity*, 2008, 76(3): 1314-1318.
- [60] Rasetti-Escargueil C, Popoff M R. Recent developments in botulinum neurotoxins detection [J]. *Microorganisms*, 2022, 10(5):1001.
- [61] Hackett G, Moore K, Burgin D, et al. Purification and characterization of recombinant botulinum neurotoxin serotype FA, also known as serotype H [J]. *Toxins*, 2018, 10(5):195.
- [62] Ayyar B V, Aoki K R, Atassi M Z. The C-terminal heavy-chain domain of botulinum neurotoxin a is not the only site that binds neurons, as the N-terminal heavy-chain domain also plays a very active role in toxin-cell binding and interactions [J]. *Infection and immunity*, 2015, 83(4): 1465-1476.
- [63] Gardner A P, Barbieri J T. Light chain diversity among the botulinum neurotoxins [J]. *Toxins*, 2018, 10(7):268.
- [64] Ayyar B V, Tajhya R B, Beeton C, et al. Antigenic sites on the HN domain of botulinum neurotoxin A stimulate protective antibody responses against active toxin [J]. *Scientific reports*, 2015, 5: 15776.
- [65] Li Z, Lu J, Tan X, et al. Functional EL-HN Fragment as a potent candidate vaccine for the prevention of botulinum neurotoxin serotype E [J]. *Toxins*, 2022, 14(2):135.
- [66] Washbourne P, Pellizzari R, Rossetto O, et al. On the action of botulinum neurotoxins A and E at cholinergic terminals [J]. *Journal of physiology, Paris*, 1998, 92(2): 135-139.
- [67] Antonucci F, Rossi C, Gianfranceschi L, et al. Long-distance retrograde effects of botulinum neurotoxin A [J]. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for*

- Neuroscience, 2008, 28(14): 3689-3696.
- [68] Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis [J]. *Physiological reviews*, 2000, 80(2): 717-766.
- [69] Solabre Valois L, Wilkinson K A, Nakamura Y, et al. Endocytosis, trafficking and exocytosis of intact full-length botulinum neurotoxin type a in cultured rat neurons [J]. *Neurotoxicology*, 2020, 78: 80-87.
- [70] Verderio C, Rossetto O, Grumelli C, et al. Entering neurons: botulinum toxins and synaptic vesicle recycling [J]. *EMBO reports*, 2006, 7(10): 995-999.
- [71] Pellett S. Progress in cell based assays for botulinum neurotoxin detection [J]. *Current topics in microbiology and immunology*, 2013, 364: 257-285.
- [72] Masuyer G, Beard M, Cadd V A, et al. Structure and activity of a functional derivative of *Clostridium botulinum* neurotoxin B [J]. *Journal of structural biology*, 2011, 174(1): 52-57.
- [73] Chaddock J A, Herbert M H, Ling R J, et al. Expression and purification of catalytically active, non-toxic endopeptidase derivatives of *Clostridium botulinum* toxin type A [J]. *Protein expression and purification*, 2002, 25(2): 219-228.
- [74] Blum F C, Chen C, Kroken A R, et al. Tetanus toxin and botulinum toxin a utilize unique mechanisms to enter neurons of the central nervous system [J]. *Infection and immunity*, 2012, 80(5): 1662-1669.
- [75] Rummel A. Double receptor anchorage of botulinum neurotoxins accounts for their exquisite neurospecificity [J]. *Current topics in microbiology and immunology*, 2013, 364: 61-90.
- [76] Weisemann J, Stern D, Mahrhold S, et al. Botulinum neurotoxin serotype a recognizes its protein receptor SV2 by a different mechanism than botulinum neurotoxin B synaptotagmin [J]. *Toxins*, 2016, 8(5):154.
- [77] Schmitt M, Dehay B, Bezard E, et al. U18666A, an activator of sterol regulatory element binding protein pathway, modulates presynaptic dopaminergic phenotype of SH-SY5Y neuroblastoma cells [J]. *Synapse*, 2017, 71(9):1-20.
- [78] Gustafsson R, Zhang S, Masuyer G, et al. Crystal structure of botulinum neurotoxin A2 in complex with the human protein receptor SV2C reveals plasticity in receptor binding [J]. *Toxins*, 2018, 10(4):153.
- [79] Pellett S, Tepp W H, Johnson E A. Botulinum neurotoxins A, B, C, E, and F preferentially enter cultured human motor neurons compared to other cultured human neuronal populations [J]. *Federation of European Biochemical Societies letters*, 2019, 593(18): 2675-2685.
- [80] Fischer A, Montal M. Single molecule detection of intermediates during botulinum neurotoxin translocation across membranes [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(25): 10447-10452.
- [81] Burgin D, Périer C, Hackett G, et al. New modified recombinant botulinum neurotoxin type F with enhanced potency [J]. *Toxins*, 2021, 13(12):834.
- [82] Cai S, Singh B R. Role of the disulfide cleavage induced molten globule state of type a botulinum neurotoxin in its endopeptidase activity [J]. *Biochemistry*, 2001, 40(50): 15327-15333.
- [83] Kukreja R V, Sharma S K, Singh B R. Molecular basis of activation of endopeptidase activity of botulinum neurotoxin type E [J]. *Biochemistry*, 2010, 49(11): 2510-2519.

- [84] Pellett S, Tepp W H, Stanker L H, et al. Neuronal targeting, internalization, and biological activity of a recombinant atoxic derivative of botulinum neurotoxin A [J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2011, 405(4): 673-677.
- [85] 段丽娟, 李育合, 谢小荣, 等. 胰酶激活的 E 型肉毒毒素及其类毒素免疫原性研究[J]. *中国医药生物技术*, 2018, 13(1):4.
- [86] Zuverink M, Chen C, Przedpelski A, et al. A heterologous reporter defines the role of the tetanus toxin interchain disulfide in light-chain translocation [J]. *Infection and immunity*, 2015, 83(7): 2714-2724.

## 学位论文数据集

表 1.1: 数据集页

关键词*	密级*	中图分类号	UDC	论文资助
E 型肉毒毒素； 功能结构域；生 物活性；激活环 形区；作用机制	公开			
学位授予单位名称*		学位授予单位代 码*	学位类别*	学位级别*
北京交通大学		10004	理学硕士	硕士
论文题名*		并列题名		论文语种*
E 型肉毒毒素结构域的功能活性与 作用机制研究				中文
作者姓名*	谈肖		学号*	20121612
培养单位名称*		培养单位代码*	培养单位地址	邮编
北京交通大学		10004	北京市海淀区西直 门外上园村 3 号	100044
学科专业*		研究方向*	学制*	学位授予年*
生物学		生物毒素	3	2023
论文提交日期*	2023 年 6 月			
导师姓名*	徐青		职称*	副教授
评阅人	答辩委员会主席*		答辩委员会成员	
	成喜雨			
电子版论文提交格式 文本 ( ) 图像 ( ) 视频 ( ) 音频 ( ) 多媒体 ( ) 其他 ( ) 推荐格式: application/msword; application/pdf				
电子版论文出版 (发布) 者		电子版论文出版 (发布) 地		权限声明
论文总页数*	81			
共 33 项, 其中带*为必填数据, 为 21 项。				