

若干蛇毒蛋白的结构生物学研究

牛立文,滕脉坤,朱中良,高永翔,张平

(中国科学技术大学生命科学学院,安徽合肥 230027)

摘要:以本研究组较有研究特色的五种蛇毒蛋白家族为线索,简要综述了蛇毒金属蛋白酶、蛇毒丝氨酸蛋白酶、蛇毒 crisp 蛋白、蛇毒磷脂酶 A2 及蛇毒神经毒素等蛋白家族有关结构生物学研究的结果、现状及进展.强调了蛇毒蛋白研究中蛇毒糖蛋白的结构生物学研究、超高分辨率晶体学研究及与蛇毒蛋白相关的复合物结构生物学研究的重要性.

关键词:蛇毒毒素;晶体结构;金属蛋白酶;丝氨酸蛋白酶;磷脂酶;富含半胱氨酸分泌蛋白;神经毒素;超高分辨率

中图分类号:Q71 文献标识码:A

Structural biology of some snake venom protein families

NIU Li-wen, TENG Mai-kun, ZHU Zhong-liang, GAO Yong-xiang, ZHANG Ping

(School of Life Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China)

Abstract: Following the clues from our group's characteristic investigations of five snake venom protein families, a short review was provided on some research conclusions, current opinions and latest advances from structural biology of snake venom protein families of serine proteases, metalloproteinase, CRISP, phospholipase A2 and neurotoxin as well. This review emphasized the importance of structural biology of snake venom glycoproteins, crystal structures at an ultrahigh resolution and the complex structure related to snake venom proteins in the field of snake venom proteins.

Key words: snake venom; crystal structure; metalloproteinase; serine protease; Phospholipase; Cysteine-rich secretory protein; neurotoxin; ultra-high resolution

0 引言

毒蛇在人类生活区域的危害时有发生,是威胁丘陵、山地地区人民生产、生活的物种之一.毒蛇咬

伤对人体危害的原由是由于蛇毒毒素对人类血液和神经系统造成伤害.蛇毒的研究,对于了解蛇毒毒素的生物学和毒理学性质具有重要的意义.蛇毒为多种学科的基础理论和应用研究提供了特殊资源并在

收稿日期:2008-07-05;修回日期:2008-08-10

基金项目:国家杰出青年科学基金(3002512),国家自然科学基金委创新研究群体科学基金(3012001)资助.

作者简介:牛立文(通讯作者),教授,微尺度物质科学国家实验室生物大分子结构与功能研究部执行主任.国家杰出青年科学基金获得者并获中国科学院“百人计划”杰青后续择优支持.1982年本科毕业于中国科学技术大学生物学系,1986年硕士毕业于中国科学院生物物理研究所,1993年和1995~1996年美国Purdue大学生物学系 Research Associate.主要从事结构生物学研究.曾主持国家自然科学基金重点项目、中国科学院知识创新工程重要方向性项目等研究任务.2006年被聘为国家重点基础研究发展(973)计划项目“蛋白质机器及分子机制”首席科学家.已在 Science, J. Biol. Chem., Biochemistry, Proteins 等国际学术期刊发表论文. E-mail: lwniu@ustc.edu.cn

滕脉坤,男,1956年生,教授,中国科学技术大学生命科学学院书记、副院长. E-mail: mkteng@ustc.edu.cn

人们认识自然和天然资源利用等方面发挥着重要的作用。蛇毒毒素中含有丰富蛋白质(比如,尖吻蝮蛇的干燥毒粉中蛋白含量高达~70%),是多种基因表达物的浓缩版,为人们研究不同的蛋白功能、特性提供了便利的材料;更重要的是人们对蛇毒的毒性作用的理解可以借鉴到药物的设计、开发及应用上。由于毒蛇对人类的伤害作用,人们对于蛇毒毒素的研究已有很长的历史,一直在关注蛇毒这种特殊的生物体分泌物。由于一些蛇毒能毒害生物体的血液系统,而另一些则使神经系统功能出现紊乱;早期人们对毒蛇危害的临床观察及简单的动物实验使人们将蛇毒的毒性分成循环型毒及神经型毒。随着现代生物化学及分子生物学技术的发展,人们很快就将这些技术应用于蛇毒的研究,逐渐发展的蛋白质分离纯化技术及分子生物学技术使人们能得到高纯度蛇毒蛋白的均一成分及一级结构信息。这些结果使人们认识到循环型蛇毒中有诸如属于金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、L-氨基酸氧化酶、磷脂酶 A2、CRISP 蛋白及 C 型凝集素类似蛋白等家族的蛋白,而神经型蛇毒中则有分属不同家族的多种神经毒素等蛋白。现代生物学中方兴未艾的各种组学(x-omics)的概念也交叉到在蛇毒研究中,人们正期待从这些高通量的蛇毒蛋白质组(snake venom proteomes)及毒腺转录本组(venom gland transcriptome)等学科中获得对蛇毒及毒蛇本身更加深入的认识^[1,2]。

开展蛇毒蛋白的结构生物学的研究,不仅是因为蛇毒本身为结构生物学工作者提供了诸多便利,也是结构生物学为了丰富本学科内容的选题结果。重要的是,以结构-功能关系为研究主轴的结构生物学对蛇毒蛋白的研究能为人们理解功能多样化的蛇毒蛋白提供空间结构基础,同时也有助于天然蛇毒在基础研究及药物设计等方面的应用。本文将对本研究组较有研究特色的五种蛇毒蛋白家族为线索,简要综述这些蛇毒蛋白家族的结构生物学的研究结果、现状及进展。

1 蛇毒金属蛋白酶

锌金属蛋白酶是一类参与多种生物学及病理学过程的蛋白,与胚胎发育、骨髓形成、破伤风、生殖、癌症转移等密切相关。蛇毒金属蛋白酶属于锌金属蛋白酶超家族的成员,是蛇毒蛋白的主要活性组分,其主要的生理功能是破坏猎物的凝血系统,常引起局部或系统性出血。此外,该类蛋白还具有引起细胞

凋亡、炎症反应等活性^[3]。对南美矛头蝮蛇的研究表明蛇毒金属蛋白酶在蛇毒蛋白质组和转录组中的含量都超过 50%^[1]。

1994 年 Bjarnason & Fox 根据结构域的组成将蛇毒金属蛋白酶分为 P I ~P IV 四种类型^[4]。P I 型仅含有一个金属蛋白酶结构域(metalloproteinase domain);P II 型除金属蛋白酶结构域外还包含一个去整合素或类去整合素结构域(disintegrin or disintegrin-like domain);P III 型含有金属蛋白酶结构域、去整合素或类去整合素结构域和富含半胱氨酸结构域(cysteine-rich domain);P IV 型除了以上三个结构域外还含有一个通过二硫键与上述三个结构域连接的类 C 型凝集素结构域(C-type lectin-like domains)。根据出血活性的强弱,P I 型又分为两个亚型:P I A 亚型,具有较强出血活性;P I B 亚型,无出血活性或仅有弱出血活性。2005 年 Fox & Serrano 对此分类法又进一步调整^[5],增加了几种亚型,包括:P II a 亚型,该亚型不会释出去整合素结构域;P II b 亚型,该亚型会形成二聚体;D-I 型,不含金属蛋白酶结构域;P III a 型,会释出去整合素和富含半胱氨酸结构域;P III b 型,会形成二聚体。

已知的蛇毒金属蛋白酶有些具有强出血活性,有些却没有出血活性或仅具有弱出血活性,从它们的序列比对,人们找不出与出血活性对应的特异性残基。一些有出血活性的蛇毒金属蛋白酶与非出血活性的蛇毒金属蛋白酶之间的序列相似性甚至超过同样有出血活性的蛇毒金属蛋白酶的序列相似性。因此,尽管已有 200 多个蛇毒金属蛋白酶的序列得到测定,但从序列上预测出血活性仍是一个难题。人们只能期待从这些蛋白的三维结构信息中获得线索。

分别来自于东部菱背响尾蛇(*Crotalus adamanteus*)^[6]和西部菱背响尾蛇(*Crotalus atrox*)^[7]的 Adamalysin II 和 atrolysin C 是最早获得晶体结构解析的蛇毒金属蛋白酶,它们分子量均为 24 kD,含有 202 个氨基酸残基和两对二硫键,都是弱出血活性的 P I B 亚型蛇毒金属蛋白酶。此后又有 H2-proteinase^[8]、acutolysin C^[9]、TM-3^[10]、BaP1^[11]、FII^[12]等 5 个 P I B 亚型蛇毒金属蛋白酶的晶体结构被解析。

所有已知的 P I 型蛇毒金属蛋白酶的空间结构都很相似,整个分子呈椭球状,活性中心的裂隙将整

个分子分为大小两个结构域. N-端的大结构域由 5 条 β 链和 4 段 α 螺旋组成一个开放扭曲的 α/β 结构, C 端小结构域中含有一段较长的 α 螺旋和多个转折, 其中一个转折中含有一对二硫键和一个保守的甲硫氨酸转折. 两个结构域的结合部形成活性中心裂隙, 酶活性所必须的锌离子位于裂隙底部, 与三个组氨酸配位(如图 1). 蛇毒金属蛋白酶中含有两段特征序列 HEXXHXXXXXH 和 CIM, 其中 CIM 构成活性中心所必需的甲硫氨酸转折, 稳定锌离子的配位^[13].

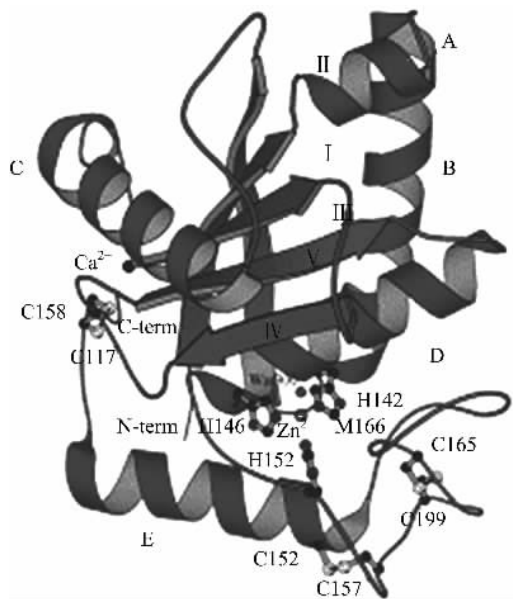


图 1 P I 型金属蛋白酶的空间结构

Fig. 1 Structure of P I type metalloproteinase from agkistrodon acutus

1998 年本实验室发表了来源于皖南尖吻蝮蛇 (*Deinagkistrodon acutus*) 的 acutolysin A 的晶体结构^[14], 这是目前唯一获得结构解析的具有强出血活性的 P I A 型金属蛋白酶. 对 acutolysin A 在 pH5.0 (低活性) 和 pH7.5 (高活性) 条件下的晶体结构观测表明, 两种结构中催化分子与 Glu143 侧链氧原子间的距离发生了变化. 在弱碱性条件下, 锌离子与 Glu143 残基的侧链氧原子之间的平均距离比弱酸性条件下要小, 推测其催化活性改变可能与此相关.

P III 型蛇毒金属蛋白酶的出血活性通常强于 P I 型, 人们推测去整合素结构域和富含半胱氨酸结构域可能在受体识别等方面发挥着重要作用. 2006 年, Takeda 解析了来源于西部菱背响尾蛇 (*Crotalus atrox*) 的 P III 型金属蛋白酶 VAP1 的晶

体结构^[15]. 该结构整体呈“C”字形, 过去曾认为可以与去整合素相互作用的去整合素结构域的 loop 被富含半胱氨酸结构域包裹, 从而不可能与蛋白质结合. 而富含半胱氨酸结构域的超变区 (hyper-variable region, HVR) 则可能是发生蛋白-蛋白相互作用的区域. 该区域位于 C 形臂的远端, 面对催化位点. 该蛋白结构的解析为人们了解 P III 型蛇毒金属蛋白酶乃至 ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) 家族与受体作用的分子机制提供了线索.

VAP1 通过分子间二硫键形成同源二聚体, 因此属于 P III b 亚型. 2007 年 Igarashi 等解析了同样来源于西部菱背响尾蛇 (*Crotalus atrox*) 的 P III a 亚型蛇毒金属蛋白酶 VAP2B 的晶体结构^[16] (如图 2), 该蛋白与 VAP1 序列相似性 56%, 呈单体状态. 通过比较 VAP2B 单体结构和 VAP1 的结构发现该类型蛋白呈动态、柔性的标准组件结构 (modular architecture), 这种柔性结构对于 ADAM/adamalysin /reprolysin 家族与底物的识别可能是非常重要的.

2007 年, 一个 P IV 型蛇毒金属蛋白酶——RVV-X 的结构得到解析^[17]. 该蛋白的前三个结构域同样形成“C”字形的结构, 而与 VAP1、VAP2B 不同的是, 由于金属蛋白酶结构域与富含半胱氨酸结构发生非特异性的相互作用, RVV-X 的这三个结构域形成一个闭合的“C”字形. 两条凝集素、类凝集素轻链则形成一个直臂, 与前三个结构域共同形成一个“扳手”形.

本课题组解析了一个来源于皖南尖吻蝮蛇 (*Deinagkistrodon acutus*) 的 P III 型蛇毒金属蛋白酶 AaH 的晶体结构 (尚未发表). 与 VAP1、VAP2B 有所不同, 该蛋白具有自降解的性质^[18]. 此外, 本课题组发现, 从竹叶青蛇 (*Viridovipera stejnegeri*) 中纯化得到的两种 P III 型蛇毒金属蛋白酶具有作用于钙离子通道, 引起血管平滑肌的舒张的生理性活性 (该结果尚未发表).

尽管迄今为止文献共报道了 7 个 P I 型、2 个 P III 型和 1 个 P IV 型蛇毒金属蛋白酶的晶体结构, 这些蛋白质结构的解析, 使人们对该家族蛋白的整体结构有所了解, 但由于目前尚没有关于蛇毒金属蛋白酶与其蛋白质受体复合物结构的报道, 因此该家族蛋白识别并结合其受体的分子机制仍然未知.

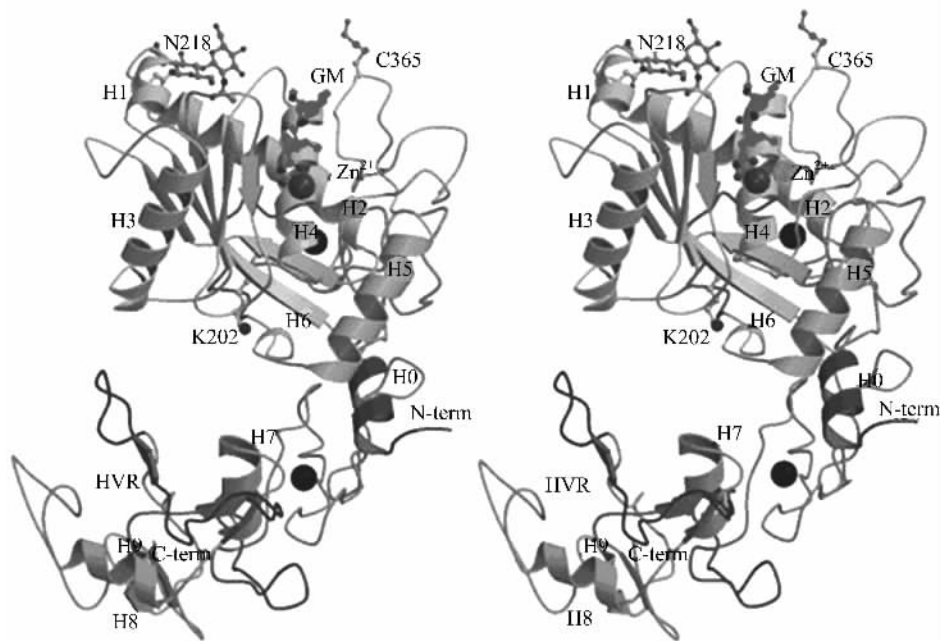


图 2 VAP1 单体的立体图对

Fig. 2 Stereo view of VAP1 protein from *Crotalus atrox*

2 蛇毒丝氨酸蛋白酶

蛇毒丝氨酸蛋白酶属于类胰蛋白酶亚家族^[19~21],广泛分布于循环型蛇毒中.在序列特性上,来源于蛇毒的丝氨酸蛋白酶,比来源于其他高等动物的丝氨酸蛋白酶(如胰蛋白酶等),在C端多出了一段约7个氨基酸残基,称为C末端延伸序列(C-terminal extension)^[21].此C末端延伸序列通过二硫键与第91位的半胱氨酸相连,从而使蛇毒丝氨酸蛋白酶比类胰蛋白酶亚家族其他成员多了一对二硫键.绝大多数蛇毒丝氨酸蛋白酶都有蛋白翻译后修饰现象,含有修饰的糖成分.体外实验表明,蛇毒丝氨酸蛋白酶能使多种血液成分发生水解性激活,其被检测的底物包括纤维蛋白原,抗凝血蛋白C,凝血V因子,Ⅹ因子,Ⅷ因子,纤溶酶原及激肽原等^[22].蛇毒丝氨酸蛋白酶的这些特性,使得蛇毒丝氨酸蛋白酶获得了一定的临床应用,而且在药理学上有进一步的开发价值.蛇毒丝氨酸蛋白酶最令人感兴趣的生物学特性是其失去了对一些天然及外位点(exosite)结合的抑制剂,如大豆胰蛋白酶抑制剂(soybean trypsin inhibitor, SBTI),水蛭素及肝素等的敏感性^[22].目前空间结构的分析结果及分子生物学研究使人们对这一现象有了一定的认识.

第一个获得空间结构解析的蛇毒丝氨酸蛋白酶

是通过重组表达的竹叶青(*Trimeresurus stejnegeri*)蛇毒的TSV-PA^[21],它具有水解激活纤溶酶的活性^[23],并且表现出对一些天然胰蛋白酶抑制剂(如SBTI)的不敏感性.空间结构的解析表明,虽然蛇毒丝氨酸蛋白酶的总体结构及活性中心催化三联体的排列与胰蛋白酶类似(如图3),但是一些loop区域,如37-loop,174-loop,60-loop,99-loop及S2底物结构部位等区域走向则表现出较大的变异.这些loop区域也是不同的蛇毒丝氨酸蛋白酶在序列上变异最大的区域,无疑地与蛇毒丝氨酸蛋白酶的功能多样性相关.在TSV-PA中,S4底物结合部位由于Arg¹⁷⁴与Asp⁹⁷所形成的盐键影响了其与底物的结合,作者推测在TSV-PA与纤溶酶原形成复合物时会涉及Asp⁹⁷的构象变化;S2'部分空间被Phe¹⁹³的芳香环所占据,妨碍了整个分子与一些蛋白酶抑制剂(如SBTI)及底物的结合,该结果被后续的实验所证实并解释了生化实验的结果^[24~26].

本课题组对来源于皖南尖吻蝮蛇的两个天然蛇毒丝氨酸蛋白酶AaV-SP-I和AaV-SP-II的生物学特性、酶学特性进行了研究,并测定了这两个糖蛋白的空间结构^[27,28].这也是第一次获得的天然来源的蛇毒丝氨酸蛋白酶的空间结构.从这两个蛋白的结构中,我们首次观测到蛇毒丝氨酸蛋白酶糖修饰成分可能扮演的功能及特性角色.通过晶体结构的

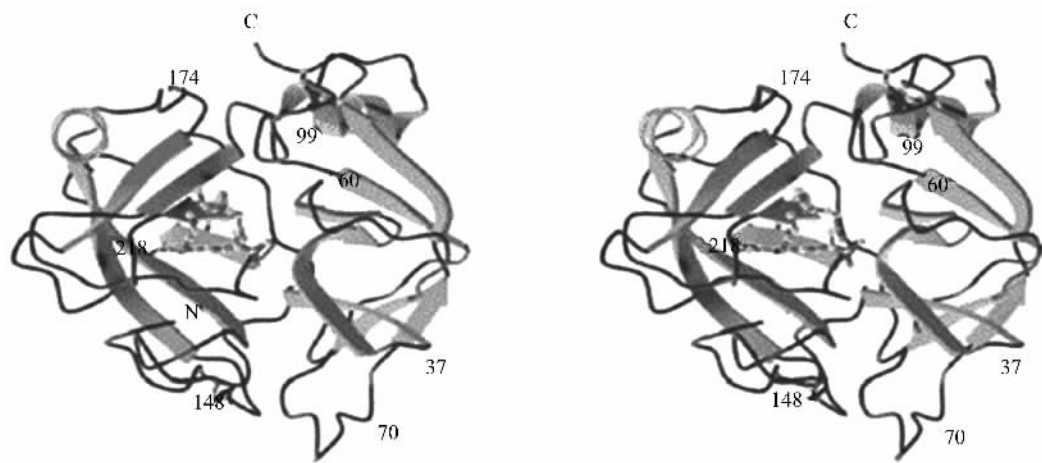
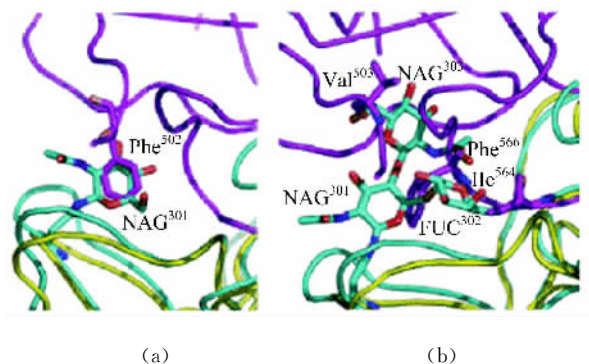


图 3 TSV-PA 的立体图对结构

Fig. 3 Stereo view of TSV-PA protein

比较分析,发现 Asn35 位的糖成分所占据的空间位置妨碍了它们与一些天然抑制剂的结合(如图 4),这种糖介导的空间障碍是造成一些蛇毒丝氨酸蛋白酶对一些天然蛋白酶抑制剂不敏感的原因,这是人们以前不曾知道的一种方式.此外,虽然这两种蛋白在氨基酸序列上仅差一个残基,但是在糖成分含量上存在差异,含糖较高的 AaV-SP- I 中的糖成分似乎对催化三联体的正常排列亦有一定的作用,从而使 AaV-SP- I 表现出比含糖较低的 AaV-SP- II 具有更高的小分子底物水解活性.



For showing the collision between the side-chains of some residues of SBTI and carbohydrates of AaV-SPs.

图 4 AaV-SP- II (a) 及 AaV-SP- I (b) 与胰蛋白酶-SBTI 复合物的空间结构叠合

Fig. 4 Superimposition of AaV-SP- II (a) and AaV-SP- I (b) with trypsin-SBTI complex

另一个来源于 *Agkistrodon contortrix contortrix* 的天然及苯甲醚抑制状态的蛇毒丝氨酸蛋白酶 ACC-C 的晶体结构获得了测定^[29]. 这种在临

床检验中已获得应用的蛇毒抗凝蛋白 C 激活物(商品名为 Protac[®])能以不依赖于凝血酶-凝血调节蛋白(thrombin-thrombomodulin)的方式激活抗凝蛋白 C,因而能方便地检测出血液中的蛋白 C 及蛋白 S 的含量^[30]. 晶体结构的分析表明,位于催化位点的正电荷区域及观测到的三个单糖分子可能涉及对抗凝蛋白 C 的识别、结合及激活. 观察苯甲醚抑制状态的结构,发现苯甲醚的结合本身不能影响催化三联体的排列,因而与实验观测到的该蛋白对小分子的酰氨水解酶的活性不受苯甲醚的抑制影响相一致. 结构分析也表明,ACC-C 对天然抑制的不敏感既涉及 Trp⁹⁹ 的侧链(与 TSV-PA 类似)也涉及 37-loop 中的糖成分(与 AaV-SPs 类似).

值得提出的是,虽然对蛇毒丝氨酸蛋白的生物学特性及序列分析的报道很多(据目前不完全统计,Genbank 收录了约 50 种这种蛋白的序列),但是由于高度的糖基化而带来的纯化及结晶难度,在 PDB 中收录的蛇毒丝氨酸蛋白酶的空间结构,目前只有上述四个蛋白. 对功能、特性各异的这类蛇毒丝氨酸蛋白酶空间结构的系列测定将既是一种挑战,也是非常具有结构生物学意义的工作.

3 蛇毒磷脂酶 A2

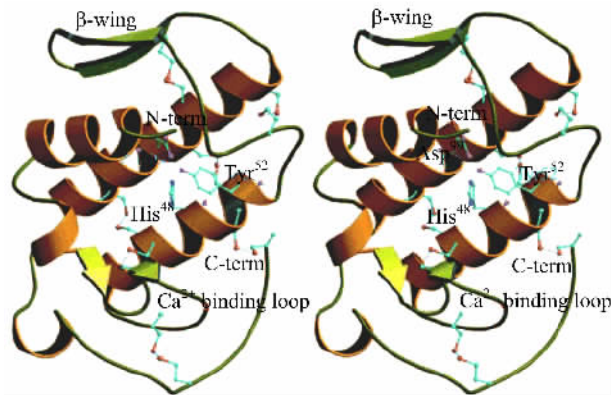
磷脂酶 A2(phospholipase A2, PLA2)催化磷酸甘油三酯的 Sn-2 位酯键水解,生成脂肪酸和溶血磷脂. 磷脂酶 A2 广泛存在于动物的消化液中,蛇毒中也有广泛分布. 体内的 PLA2 可以分布在细胞内也可以分布在细胞外,分别称为胞浆型(cytosolic)

和分泌型(secreted)PLA2^[31]. 实际上随着各种各样的 PLA2 的发现,对 PLA2 的系统分属也是在不断的更新之中. 目前文献中的分类将各种来源、生物化学性质不同的 PLA2 分成 15 组(group)^[32],其中蛇毒 PLA2 分属 I A(源自眼镜蛇科,海蛇科蛇毒中)、II A(源自响尾蛇科蛇毒中)及 II B(源自蝰蛇科蛇毒中)三个组. 然而,在蛇毒中,常常以有无结合的钙离子(或者钠离子)来命名 PLA2,一种称为 Asp⁴⁹型的 PLA2,相对的另一类称为 Lys⁴⁹型 PLA2;前者具有钙离子结合部位(在残基 49 部位),其 49 位的残基为 Asp 或者 Ser,可结合钙离子或者钠离子,具有较高的酶活性;后者 49 位的残基为 Lys 或者 Arg, Lys 侧链上的 N ζ 的原子(或者 Arg 侧链上的胍基^[33])占据了 Asp⁴⁹型中的金属离子的位置,因此这类 PLA2 不能结合钙离子,而结合的钙离子是蛋白酶活性所必需的,因此这类 PLA2 仅有较低的酶活性或者没有酶活性. 目前发现的蛇毒 PLA2 均为低分子量型(13~15 kD),绝大多数含有 7 对二硫键. 尽管某些蛇毒 PLA2 并无酶活性,但它们仍呈现出多种毒理及药理作用. 这些药、毒理作用包括抗凝、诱导与抑制血小板聚集、溶血、肌肉毒性、细胞毒性、神经毒性及水肿等. 因此,蛇毒 PLA2 也常被称为肌肉毒素、神经毒素等. 值得一提的是,蛇毒 PLA2 的药理及毒理作用有些可能与 PLA2 酶活性有关,如 PLA2 结合凝血酶原酶复合物上的磷脂并水解这些磷脂而抑制复合物(磷脂-Va-Xa-Ca²⁺)的活性^[34];而有些无酶活性的 PLA2(如 Lys⁴⁹型)所致的毒性作用,目前并不是十分明了,一些推测认为可能是与蛇毒 PLA2 本身组装四级结构后衍生的界面特性有

关^[35]. 目前人们似乎倾向认为 C 末端的约 13 个残基与一些没有酶活性(Lys⁴⁹型)的 PLA2 毒性的形成有关^[36].

多种蛇毒来源的 PLA2 的晶体结构获得了测定. 据不完全统计, PDB 中收录的与蛇毒 PLA2 相关的坐标有多达 40 个以上. 这些结构研究显示了蛇毒 PLA2 有着一般 PLA2 的基本结构特点^[37,38]:包括三段 α 螺旋; H1, H2 和 H3, 一个短的双股反平行 β 折叠(又称 β 翼, β -wings), 一个钙离子结合环, 以及连接它们的多段 loop 和七对二硫键(如图 5); 并基于结构与过渡态类似物提出了催化机理^[39]. 近几年有关蛇毒 PLA2 的结构生物学研究主要涉及以下三个方向的内容.

(I) 对功能不同的 PLA2 的结构进行观测,试图发现具有不同药理毒理等功能的结构基础及机理. 如:对来源于 *Bothrops pirajai* 中的 PLA2 piratoxin III 的结构观测提出钙结合 loop 可能与底物结合的协作性有关^[40];对来源于 *Agkistrodon blomhoffii brevicaudus* 的 PLA2 的结构研究,观测到钙离子及镉离子的配位状态,说明了底物结合与离子配位之间的关系^[41];对来源于小眼蛇(*Micropechis ikaheka*)毒的三个 PLA2 的同功酶的研究,表明其 C 末端的结构可能含有与 M 型受体结合的模体^[42];对来源于 *A. contortrix laticinctus* 中的 ACL myotoxin(Lys⁴⁹)不同构象的晶体结构观测,发现在疏水性通道存在配体(如月桂酸)的结构中,接近 C 末端的部位诱导了由一些疏水性残基(包括 Phe¹²¹及 Phe¹²⁴等)的侧链共同形成所谓疏水关节(hydrophobic knuckle),这种特性可能与其没



The locations of seven disulfide bonds connecting the polypeptide chain backbone as well as the catalytic triad consisting of His⁴⁸, Tyr⁵², and Asp⁹⁹ are shown.

图 5 蛇毒 PLA2 的总体结构

Fig. 5 Ribbon representation of the overall structure of PLA2

有酶活性但是具有破坏质膜活性、肌肉毒性的特性有关^[43]。令人感兴趣的是,在几种蛇毒 PLA2 的晶体结构中观测到了天然存在的脂肪酸分子^[43~45],有些还含有糖类^[46]。本研究组对来源于中华眼镜蛇 (*Naja atra*) 毒中的神经毒性 PLA2-Natratoxin 的结构及相关功能研究发现^[47],Natratoxin 对 A-型 K (+) 电流有抑制作用,其与 K_v 通道蛋白的结合可能是通过位于 C 末端的区域来完成对通道的抑制作用;在蛋白靶向结合其通道配体的识别时,关键氨基酸在空间上的分布起主要的作用。

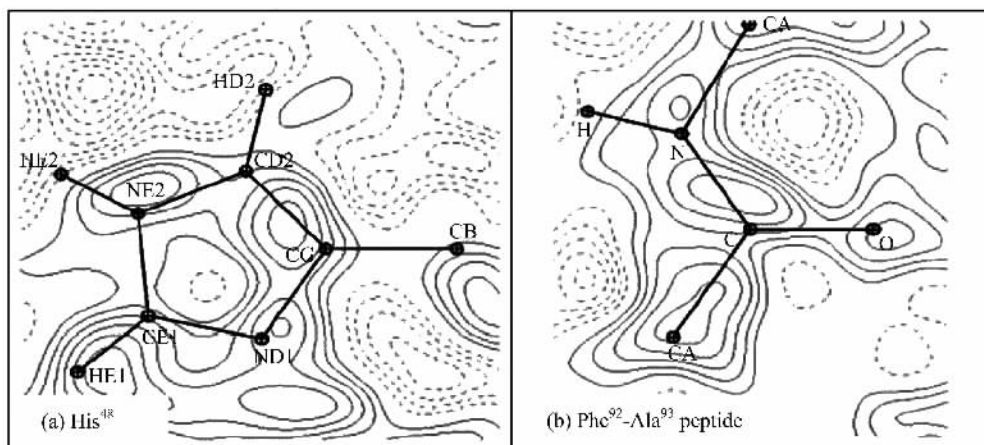
(II) 以 PLA2 为靶标,对筛选出的小分子抑制剂或者消炎药物酶-抑制剂(设计药物)复合物进行结构与功能关系的研究。由于 PLA2 释放的产物涉及脂肪酸在机体内的代谢、前列腺素的产生及炎症发生等生物学过程,对这些蛋白-配基复合物的结构观测,将有助于对炎症及其他疾病的(候选)药物的优化及改进。如:以 *Daboia russelli pulchella* (DRP) 蛇毒中的 PLA2 为模型观测了它与其抑制性的肽段(FLSYK^[48], LAIYS^[49])、具有高亲和力的植物碱马兜铃酸(alkaloid aristolochic acid)^[50]、具有高特异及特效抑制活性的生育酚(α -Tocopherol, Vitamin E)、阿托品(atropine^[51]、阿司匹林(Aspirin)^[49]等复合物的结构。这些复合物的结构都表明形成复合后的蛋白在钙结合 loops、 β -wings 及 C 末端区域蛋白的构象会发生一些变化,其中有些在 Trp³¹ 及其所在 loop 有明显的结构上的改变。另外对来源于 *Bothrops asper* 的 PLA2

myotoxin II 与其抑制药物苏拉明(Suramin)的复合物结构也进行了观测^[52],表明苏拉明在同时结合两个单体表面时,能部分地限制底物对活性中心的接近,并能改变蛋白识别界面上电荷的总体分布,从而抑制蛋白毒性。

(III) 以蛇毒 PLA2 为实验材料,开展超高分辨率晶体学研究。近年来由于同步辐射光源技术、低温晶体衍射技术以及晶体衍射探测技术等方面的进步,使得一些蛋白质的晶体衍射可以达到超高分辨率的水平。按照 T. Petrova 等人的观点,如果一个晶体结构的分辨率超过 0.85 Å 则被认为是到达亚原子水平的超高分辨率^[53]。本研究组从皖南尖吻蝮蛇毒中纯化出蛇毒 PLA2 acutohaemolysin,并获得了高质量的晶体,用直接法测定了 0.8 Å 分辨率的晶体结构^[54]。Acutohaemolysin 的结构包含 1 010 个非氢原子及 232 个水分子。从超高分辨率的结构中我们观测到了通常分辨率(~ 2 Å)难以观测到的残基多重构象,直接观测到了多个氢原子(约 72% 的主链氢原子,这些在通常分辨率的结构中是无法观测到的)的结构;实验观测到了催化残基 His⁴⁸ 的质子化状态(如图 6);结构分析也同时表明, Phe¹⁰² 的侧链可能阻止的底物的进入,从而使其失去了酶活性。而在第 10 位上由于是一个 Try, 替代了保守的 Leu, 从而使其不能发生二聚体化,这可能是其失去了溶血活性的原因。

4 蛇毒富含半胱氨酸分泌蛋白

富含半胱氨酸分泌蛋白(cysteine-rich



These residual maps illustrate the side chain of catalytic residue His⁴⁸ (a) and the dipeptide Phe⁹²-Ala⁹³ (b).

图 6 超高分辨率的电子密度图

Fig. 6 Residual maps that were obtained after high order refinement and contoured at $0.05 \text{ e}/\text{\AA}^3$ reveal peaks of electron density between the bonded atoms

secretory proteins, CRISPs) 是近十年内、最初在哺乳动物附睾和粒细胞中发现的一类分泌蛋白, 之后在所有研究的脊椎动物中都发现了 CRISP, 它们在精子的成熟和免疫系统中发挥作用. 虽然这些蛋白的功能还不是很清楚, 但是它们的全长氨基酸序列具有明显的序列保守性, 所有的 16 个半胱氨酸都是严格保守的, 14 个半胱氨酸残基位于 C 端, 其中 10 个位于 PR-1 结构域 (pathogenesis-related type-1 protein superfamily, PR-1) 后面的约 60 个残基的羧基端区域, 但是 N 端的保守性更强. 所有的 16 个半胱氨酸都参与二硫键的形成, 形成 8 对二硫键. 除了哺乳动物和爬行类动物外, 人们在其他物种中也发现了 CRISP 家族的成员. 这些物种包括: 果蝇^[55]、爪蟾^[56]、线虫^[57]、毒蜥蜴^[58]和锥形蜗牛^[59]等. 功能研究表明在不同的生物体中分布的 CRISPs 展现出不同的生物学活性. 如墨西哥珠状蜥蜴毒 (Mexican beaded lizard; *H. h. horridum*) 中的 CRISP 蛋白 helothermine, 是一种离子通道阻断剂, 能够调节大量的离子通道, 包括电压门控的钙通道, 电压门控的钾通道和 ryanodine 受体^[60]. 非洲爪蟾卵胶膜中 CRISP 蛋白 allurin, 是一种介导精母细胞和 steritoli 细胞粘附的精子细胞趋化剂^[56]. 线虫中的 CRISP 家族蛋白由转录因子 DAF-16 调控的 SCL-1, 被认为对线虫的寿命和对外界压力耐受有正调控作用^[57]. 锥形蜗牛的毒素中, 有一种包含 22 个半胱氨酸残基的类似于 CRISP 蛋白的 Tex31, 可以发挥类似于丝氨酸蛋白酶活性的功能^[59]. 因此, 基于这种功能的多样性, 大多数的 CRISP 家族的分子靶位仍然有待于被发现.

已知的蛇毒 CRISP 的功能可以分为两类: 一类可抑制环核苷酸门控 (cyclic nucleotide-gated, CNG) 的离子通道, 另一类可抑制高电导钾离子诱导的平滑肌收缩.

目前, 发现的 CNG 通道蛋白阻断剂的蛇毒 CRISP 蛋白有来源于 *Pseudechis australis* 蛇毒的 Pseudechetoxin (PsTx) 和 *Pseudechis porphyriacus* 蛇毒的 pseudecin^[61,62]. 它们分别含有 211 和 210 个氨基酸, 两者之间有 96.7% 序列同源性. 虽然它们都可以阻断 CNG 离子通道, 但是活性却有非常大的差别, 两者对 CNGA2 亚基的通道亲和力有 30 倍的差别. 本课题组发现来源于中华眼镜蛇 (*N. atra*) 毒中 CRISP-natrin 能抑制高电导钾离子诱导的平滑肌收缩^[63]. 功能实验表明 1 μ M natrin 可以增强

高钾诱导的离体小鼠胸主动脉环收缩但不影响其基础张力, 进一步的血管平滑肌细胞全细胞膜片钳实验证实, natrin 可以抑制血管平滑肌细胞膜上大电导钙激活的钾通道 (BKca channel), 其半效抑制浓度 IC₅₀ 为 34.4 nM, Hill 系数为 1.02. 其他研究组发现 natrin 也可以抑制电压依赖性的钾通道 Kv1.3 亚型的电流^[64], 而且免疫共沉淀试验表明, Natrin 可以与 RyR 受体共沉淀, 表明 Natrin 也可以与 RyR 受体结合.

本课题组首次报道了来源于竹叶青蛇毒的 stecrisp 蛋白的晶体结构^[65]. stecrisp 晶体结构由 PR-1 结构域和 CRD 结构域组成, 两个结构域之间由一段稳定的铰链区域相连. 此家族典型的 16 个半胱氨酸残基完全配对形成 8 对二硫键, 其中 3 对在 PR-1 结构域, 2 对在铰链区, 3 对在 CRD 结构域中 (如图 7). stecrisp 在对离子通道调节特性上不同于 natrin. 通过离体血管实验证实 1 μ M stecrisp 可以激活血管平滑肌上 cGMP 敏感的离子通道升高细胞内钙浓度, 直接引起血管收缩, 两者对血管平滑肌的效应具有明显差异^[63], 然而它们的空间结构极为类似. 我们通过与后续得到的 natrin 晶体结构比较发现^[63]: CRISP 家族中的离子通道阻断效应可能是通过一段关键的残基与离子通道相互作用的. 结构分析及一级序列比对显示这些关键的功能性残基位于 CRD 的 loop I 区域. 此 loop 参与形成了两个结构域之间弱的相互作用界面. stecrisp 和 natrin 三维结构比较表明此区域的结构也有很大差异. 这可能为此家族的部分蛋白对离子通道作用的选择性提供了一定的结构基础. 通过 stecrisp 和 natrin 结构和功能研究也发现, 虽然二者一级序列和空间结构高度相似, 但其与配体结合的个别关键残基改变后,

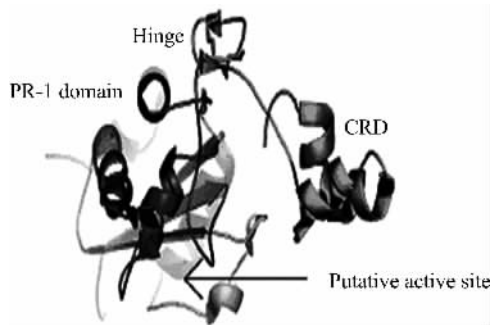


图 7 stecrisp 的结构

Fig. 7 Overall three-dimensional structure of stecrisp from *Trimeresurus stejnegeri*

其相应特性将发生根本性的变化. 其他研究组用计算机模拟的方法, 对 natrin 与 RyR 受体和钾通道 Kv1.3 的作用方式也作了一些推测^[64]; 此外对来源于烙铁头 (*Trimeresurus flavoviridis*) 中 Triflin 晶体结构也进行了测定^[66], 并对与功能相关的结构部分也作了推测.

5 蛇毒神经毒素蛋白

神经毒素主要分布在分泌神经型毒的毒蛇中, 如眼镜蛇等. 受这种毒素毒化后, 动物产生迟缓性麻痹和呼吸衰竭, 从而导致动物死亡. 按其作用靶部位的不同, 神经毒素主要可以分为突触前神经毒素和突触后神经毒素. 突触前神经毒素作用于突触前膜, 能够阻止乙酰胆碱的释放或者破坏突触前膜. 突触前神经毒素也称 β 神经毒素, 这些神经毒素的分子量都大于 10kD, 主要是一类具有 PLA2 活性的毒素^[67]. 突触后神经毒素作用于突触后膜, 它们可专一性地结合膜上乙酰胆碱受体, 阻止神经信号的传递. 这种神经毒素作用于乙酰胆碱受体的亲和力很高, 结合解离常数在 $10^{-10} \sim 10^{-11}$ M 之间, 并具有“多点接触”的特征, 结合区域覆盖相当大的受体表面, 其分子量一般小于 10 kD, 是一类没有酶活性的结合蛋白^[68,69]. 突触后神经毒素主要包括 α 神经毒素和 κ 神经毒素. α 神经毒素作用于肌肉受体或者神经受体或者对两者均有作用. 而 κ 神经毒素只作用于神经受体. α 神经毒素包括短链神经毒素和长链神经毒素. 此外还有一些神经毒素也是作用于神经-肌肉信号传递途径, 但是其作用的靶位却与上述两类神经毒素有所不同. 百余种蛇毒突触后神经毒素的全序列已获得测定, 根据氨基酸残基和二硫键数目的不同, 人们将它们分为短链神经毒素和长链神经毒素. 短链神经毒素一般含有 60~62 个氨基酸残基及四对二硫键; 而长链神经毒素含有 65~74 个氨基酸残基及 5 对二硫键. 序列比较表明, 短链神经毒素间的氨基酸序列同源性高达 70%~95%, 而短链神经毒素与长链神经毒素之间的序列同源性却只有 28%~33%^[70].

几种短链神经毒性的 NMR 结构及晶体结构很早以前就获得了测定^[71,72]. 同源的短链神经毒素的结构比较表明, 这些短链神经毒素都具有相似的折叠构象. 结构表现为由三对二硫键限制的 Loop 从一个疏水核心中伸出, 就像三个指头从掌心中伸出一样, 因此这种结构被称为三指蛋白. 在三个 loop

中各包含两条反平行的 β 链. 中间 Loop 的两条 β 链与 C 端 loop 中的一条 β 链形成三股反平行的 β 折叠片 (如图 8). 这是短链神经毒素的结构特征. 整个结构几乎不含 α 螺旋. β 折叠的含量高达 40%.

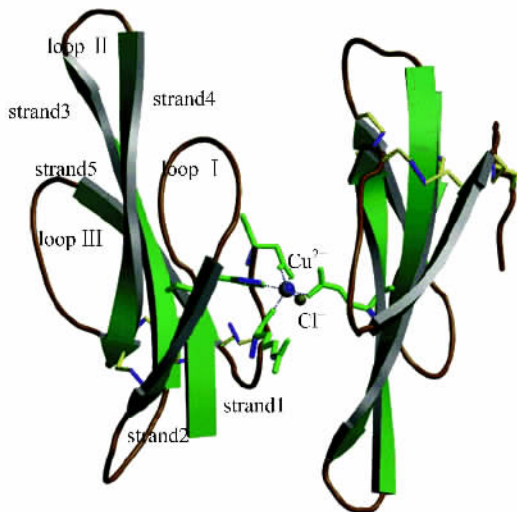
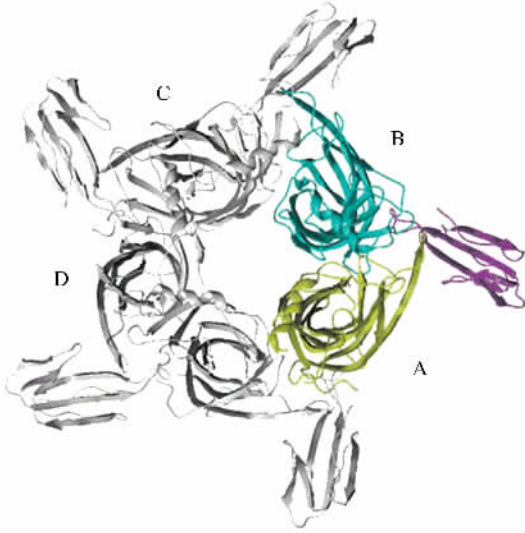


图 8 atratoxin 在一个独立区中经由铜离子连接的同源二聚体

Fig. 8 The homodimer atratoxin linked by a Cu^{2+} in the asymmetric unit

由于 α 神经毒素与乙酰胆碱受体的高亲和力, 使得这些毒素有一定的药学应用价值, 同时使人们对这些蛋白与乙酰胆碱受体结合的结构上的细节很感兴趣. 对来自莫桑比克射毒眼镜蛇 (*Naja mossambica mossambica*) 的长链 α 神经毒素与鲜水蜗牛 (*Lymnaea stagnalis*) 中的乙酰胆碱结合蛋白复合物的晶体结构观测表明^[73], 在这个五聚体的复合物中, 五个三指毒素分子均插入到乙酰胆碱结合蛋白的亚基界面中 (如图 9), 并且随着毒素分子与毒素分子的结合, 乙酰胆碱结合蛋白及毒素分子的构象均发生了变化. 尤其是, 复合物的形成使乙酰胆碱结合蛋白的 C-loop 及 F-loop 偏离了原初的定向, 形成了对三指毒素的第一指状 loop、第二指状 loop 顶端及部分 C 末端部位的包裹. 结构观测也表明, 毒素分子中保守的精氨酸及苯丙氨酸的侧链仿效了乙酰胆碱结合蛋白的激动剂的结合. 这种构象上的较大变化将有助于人们对毒素高选择性的认识, 并为静息状态下的尼克酰胺受体的构象提供了一个模板.

本研究组测定了从中华眼镜蛇 (*Naja atra*) 中获得的 α 短链神经毒素蛇毒神经毒素 atratoxin 及其低毒性的同源蛋白 atratoxin-b 的超高分辨率的



黄色与蓝色分别表示 ACh 中的 A 亚基与 B 亚基，
紫色表示蛇毒神经毒素 CbtX

图 9 CbtX-AchBP 复合物的结构

Fig. 9 The CbtX-AchBP complex structure
from *Naja mossambica mossambica*

晶体结构(晶体衍射分辨率分别为 0.87 \AA 及 0.92 \AA)^[74~76]. 由于这个 atratoxin 蛋白晶体是在有铜离子存在的条件下获得的, 所以我们不仅用铜作为晶体衍射时的反常散射源从而可以用 SAD 方法解析了这一结构, 同时在结构中观测到铜离子的配位状态(如图 8). 令人感兴趣的是, 在含有多个铜离子的 atratoxin 结构中, 一种新的五配位形式的铜离子在超高分辨率结构中被确认. 此外, 两个毒蛋白中的多个残基的多重构象及 $\sim 30\%$ 可能的氢原子在结构中被直接观测到. 结构比较及结合残基突变而导致的相关活性变化结果表明, 残基 Arg³³ 及 Arg³⁶ 位置的突变对蛋白毒性的变异起关键的作用.

6 结语

本研究组还对蛇毒蛋白中的其他蛋白成分开展了结构生物学的研究, 如蛇毒 C 型——凝集素类似蛋白, 蛇毒 L 氨基酸氧化酶等^[77~83]. 特别需要指出的是, 除了上述蛇毒 PLA2 与一些抑制剂的复合物、神经毒素与乙酰胆碱结合蛋白的复合物的结构生物学研究外, 有几个研究组对蛇毒 C 型——凝集素类似蛋白也开展了这类蛇毒蛋白与结合的靶蛋白(片段)复合物的空间结构观测, 包括抗凝蛋白与凝血 X 因子的 GLA 结构域的复合物^[84]、蛇毒蛋白 botrocetin 与 vWF 的 A1 结构域的复合物^[85] 等结构. 可以认为, 复合物的结构测定和相关功能研究,

将是包括蛇毒蛋白在内的结构生物学今后相当长时间内研究方向之一.

致谢 该课题是本实验室已开展了近 20 年的研究课题之一, 得到了包括科技部、国家自然科学基金委、中国科学院等项目经费的大力支持. 十几名研究生参与了本项目的研究. 在此一并表示感谢.

参考文献(References)

- [1] Fox J W, Serrano S M. Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures[J]. *Proteomics*, 2008, 8(4): 909-920.
- [2] Pahari S, Mackessy S P, Kini R M. The venom gland transcriptome of the Desert Massasauga rattlesnake (*Sistrurus catenatus edwardsii*): towards an understanding of venom composition among advanced snakes (Superfamily Colubroidea)[J]. *BMC Mol Biol*, 2007, 8: 115.
- [3] Moura-da-Silva A M, Butera D, Tanjoni I. Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: effects on platelets, inflammatory and endothelial cells [J]. *Curr Pharm Des*, 2007, 13(28): 2 893-2 905.
- [4] Bjarnason J B, Fox J W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms[J]. *Pharmacol Ther*, 1994, 62(3): 325-372.
- [5] Fox J W, Serrano S M. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 repolysin family of metalloproteinases[J]. *Toxicon*, 2005, 45(8): 969-985.
- [6] Gomis-Ruth F X, Kress L F, Kellermann J, et al. Refined 2.0 Å X-ray crystal structure of the snake venom zinc-endopeptidase adamalysin II. Primary and tertiary structure determination, refinement, molecular structure and comparison with astacin, collagenase and thermolysin[J]. *J Mol Biol*, 1994, 239(4): 513-544.
- [7] Zhang D, Botos I, Gomis-Rueth F X, et al. Structural interaction of natural and synthetic inhibitors with the venom metalloproteinase, atrolysin C (form d) [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(18): 8 447-8 451.
- [8] Kumasaka T, Yamamoto M, Moriyama H, et al. Crystal structure of H2-proteinase from the venom of *Trimeresurus flavoviridis* [J]. *J Biochem*, 1996, 119 (1): 49-57.
- [9] Zhu X, Teng M, Niu L. Structure of acutolysin-C, a haemorrhagic toxin from the venom of *Agkistrodon acutus*, providing further evidence for the mechanism of the pH-dependent proteolytic reaction of zinc metalloproteinases [J]. *Acta Crystallogr D Biol*

- Crystallogr, 1999,55(Pt 11): 1 834-1 841.
- [10] Huang K F, Chiou S H, Ko T P, et al. The 1.35 Å structure of cadmium-substituted TM-3, a snake-venom metalloproteinase from Taiwan habu; elucidation of a TNF α -converting enzyme-like active-site structure with a distorted octahedral geometry of cadmium[J]. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2002,58(Pt 7): 1 118-1 128.
- [11] Watanabe L, Shannon J D, Valente R H, et al. Amino acid sequence and crystal structure of BaP1, a metalloproteinase from Bothrops asper snake venom that exerts multiple tissue-damaging activities [J]. Protein Sci, 2003,12(10): 2 273-2 281.
- [12] Lou Z, Hou J, Liang X, et al. Crystal structure of a non-hemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloproteinase complexed with a novel natural tri-peptide inhibitor from venom of Agkistrodon acutus[J]. J Struct Biol, 2005,152(3): 195-203.
- [13] Bode W, Gomis-Ruth F X, Stockler W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins' [J]. FEBS Lett, 1993, 331 (1-2): 134-140.
- [14] Gong W, Zhu X, Liu S, et al. Crystal structures of acutolysin A, a three-disulfide hemorrhagic zinc metalloproteinase from the snake venom of Agkistrodon acutus[J]. J Mol Biol, 1998, 283 (3): 657-668.
- [15] Takeda S, Igarashi T, Mori H, et al. Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold [J]. EMBO J, 2006,25(11): 2 388-2 396.
- [16] Igarashi T, Araki S, Mori H, et al. Crystal structures of catrocollastatin/VAP2B reveal a dynamic, modular architecture of ADAM/adamalysin/reprolysin family proteins[J]. FEBS Lett, 2007,581(13): 2 416-2 422.
- [17] Takeda S, Igarashi T, Mori H. Crystal structure of RVV-X: an example of evolutionary gain of specificity by ADAM proteinases[J]. FEBS Lett, 2007,581(30): 5 859-5 864.
- [18] Zang J, Zhu Z, Yu Y, et al. Purification, partial characterization and crystallization of acuetin, a protein containing both disintegrin-like and cysteine-rich domains released by auto-proteolysis of a P-III-type metalloproteinase AaH-IV from Agkistrodon acutus venom[J]. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2003,59(Pt 12): 2 310-2 312.
- [19] Braud S, Bon C, Wisner A. Snake venom proteins acting on hemostasis[J]. Biochimie, 2000,82(9-10): 851-859.
- [20] Matsui T, Fujimura Y, Titani K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis [J]. Biochim Biophys Acta, 2000,1477(1-2): 146-156.
- [21] Parry M A, Jacob U, Huber R, et al. The crystal structure of the novel snake venom plasminogen activator TSV-PA: a prototype structure for snake venom serine proteinases[J]. Structure, 1998,6(9): 1 195-1 206.
- [22] Pirkle H. Thrombin-like enzymes from snake venoms: an updated inventory. Scientific and Standardization Committee's Registry of Exogenous Hemostatic Factors[J]. Thromb Haemost, 1998,79(3): 675-683.
- [23] Zhang Y, Wisner A, Xiong Y, et al. A novel plasminogen activator from snake venom. Purification, characterization, and molecular cloning [J]. J Biol Chem, 1995,270(17): 10 246-10 255.
- [24] Braud S, Le Bonniec B F, Bon C, et al. The stratagem utilized by the plasminogen activator from the snake Trimeresurus stejnegeri to escape serpins [J]. Biochemistry, 2002,41(26): 8 478-8 484.
- [25] Braud S, Parry M A, Maroun R, et al. The contribution of residues 192 and 193 to the specificity of snake venom serine proteinases[J]. J Biol Chem, 2000,275(3): 1 823-1 828.
- [26] Zhang Y, Wisner A, Maroun R C, et al. Trimeresurus stejnegeri snake venom plasminogen activator. Site-directed mutagenesis and molecular modeling[J]. J Biol Chem, 1997,272(33): 20 531-20 537.
- [27] Zhu Z, Gong P, Teng M, et al. Purification, N-terminal sequencing, partial characterization, crystallization and preliminary crystallographic analysis of two glycosylated serine proteinases from Agkistrodon acutus venom[J]. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2003,59(Pt 3): 547-550.
- [28] Zhu Z, Liang Z, Zhang T, et al. Crystal structures and amidolytic activities of two glycosylated snake venom serine proteinases[J]. J Biol Chem, 2005,280(11): 10 524-10 529.
- [29] Murakami M T, Arni R K. Thrombomodulin-independent activation of protein C and specificity of hemostatically active snake venom serine proteinases: Crystal structures of native and inhibited Agkistrodon contortrix contortrix protein C activator[J]. J Biol Chem, 2005,280(47): 39 309-39 315.
- [30] Kiesel W, Kondo S, Smith K J, et al. Characterization of a protein C activator from Agkistrodon contortrix venom[J]. J Biol Chem, 1987,262(26): 12 607-12 613.

- [31] Dennis E A. The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes[J]. Trends Biochem Sci, 1997,22(1): 1-2.
- [32] Schaloske R H, Dennis E A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system [J]. Biochim Biophys Acta, 2006,1761(11): 1 246-1 259.
- [33] Murakami M T, Kuch U, Betzel C, et al. Crystal structure of a novel myotoxic Arg49 phospholipase A2 homolog (zhaermitoxin) from Zhaoermia mangshanensis snake venom: insights into Arg49 coordination and the role of Lys122 in the polarization of the C-terminus[J]. Toxicon, 2008,51(5): 723-735.
- [34] Kini R M, Evans H J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A2[J]. Toxicon, 1989,27(6): 613-635.
- [35] da Silva Giotto M T, Garratt R C, Oliva G, et al. Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A2 homologue[J]. Proteins, 1998,30(4): 442-454.
- [36] Lomonte B, Angulo Y, Calderon L. An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action[J]. Toxicon, 2003,42(8): 885-901.
- [37] Brunie S, Bolin J, Gewirth D, et al. The refined crystal structure of dimeric phospholipase A2 at 2.5 Å. Access to a shielded catalytic center[J]. J Biol Chem, 1985,260(17): 9 742-9 749.
- [38] Wang X Q, Yang J, Gui L, et al. Crystal structure of an acidic phospholipase A2 from the venom of Agkistrodon halys pallas at 2.0 Å resolution[J]. J Mol Biol, 1996,255(5): 669-676.
- [39] Scott D L, White S P, Otwinowski Z, et al. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2 [J]. Science, 1990,250(4 987): 1 541-1 546.
- [40] Rigden D J, Hwa L W, Marangoni S, et al. The structure of the D49 phospholipase A2 piratoxin III from Bothrops pirajai reveals unprecedented structural displacement of the calcium-binding loop: Possible relationship to cooperative substrate binding[J]. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2003, 59 (Pt 2): 255-262.
- [41] Xu S, Gu L, Jiang T, et al. Structures of cadmium-binding acidic phospholipase A2 from the venom of Agkistrodon halys Pallas at 1.9 Å resolution [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 300 (2): 271-277.
- [42] Lok S M, Gao R, Rouault M, et al. Structure and function comparison of Micropechis ikaheka snake venom phospholipase A2 isoenzymes [J]. FEBS J, 2005,272(5): 1 211-1 220.
- [43] Ambrosio A L, Nonato M C, de Araujo H S S, et al. A molecular mechanism for Lys49-phospholipase A2 activity based on ligand-induced conformational change [J]. J Biol Chem, 2005,280(8): 7 326-7 335.
- [44] Lee W H, da Silva Giotto M T, Marangoni S, et al. Structural basis for low catalytic activity in Lys49 phospholipases A2—a hypothesis: the crystal structure of piratoxin II complexed to fatty acid [J]. Biochemistry, 2001,40(1): 28-36.
- [45] Singh G, Jasti J, Saravanan K, et al. Crystal structure of the complex formed between a group I phospholipase A2 and a naturally occurring fatty acid at 2.7 Å resolution[J]. Protein Sci, 2005,14(2): 395-400.
- [46] Jabeen T, Singh N, Singh R K, et al. Crystal structure of a heterodimer of phospholipase A2 from Naja naja sagittifera at 2.3 Å resolution reveals the presence of a new PLA2-like protein with a novel cys 32-Cys 49 disulphide bridge with a bound sugar at the substrate-binding site [J]. Proteins, 2006, 62 (2): 329-337.
- [47] Hu P, Sun L, Zhu Z Q, et al. Crystal structure of Natratoxin, a novel snake secreted phospholipase A2 neurotoxin from Naja atra venom inhibiting A-type K (+) currents[J]. Proteins, 2008,72(2): 673-683.
- [48] Chandra V, Jasti J, Kaur P, et al. Crystal structure of a complex formed between a snake venom phospholipase A(2) and a potent peptide inhibitor Phe-Leu-Ser-Tyr-Lys at 1.8 Å resolution[J]. J Biol Chem, 2002,277(43): 41 079-41 085.
- [49] Singh R K, Ethayathulla A S, Jabeen T, et al. Aspirin induces its anti-inflammatory effects through its specific binding to phospholipase A2: crystal structure of the complex formed between phospholipase A2 and aspirin at 1.9 angstroms resolution[J]. J Drug Target, 2005,13(2): 113-119.
- [50] Chandra V, Jasti J, Kaur P, et al. Structural basis of phospholipase A2 inhibition for the synthesis of prostaglandins by the plant alkaloid aristolochic acid from a 1.7 Å crystal structure [J]. Biochemistry, 2002,41(36): 10 914-10 919.
- [51] Chandra V, Jasti J, Kaur P, et al. First structural evidence of a specific inhibition of phospholipase A2 by alpha-tocopherol (vitamin E) and its implications in inflammation: crystal structure of the complex formed between phospholipase A2 and alpha-tocopherol at 1.8 Å resolution[J]. J Mol Biol, 2002,320(2): 215-222.
- [52] Murakami M T, Arruda E Z, Melo P A, et al. Inhibition of myotoxic activity of Bothrops asper myotoxin II by the anti-trypanosomal drug suramin[J].

- J Mol Biol, 2005,350(3): 416-426.
- [53] Petrova T P A. Protein crystallography at subatomic resolution[J]. Reports on Progress In Physics, 2004, 67(9): 1 565-1 605.
- [54] Liu Q, Huang Q, Teng M, et al. The crystal structure of a novel, inactive, lysine 49 PLA2 from *Agkistrodon acutus* venom: an ultrahigh resolution, AB initio structure determination[J]. J Biol Chem, 2003,278(42): 41 400-41 408.
- [55] Schreiber M C, Karlo J C, Kovalick G E. A novel cDNA from *Drosophila* encoding a protein with similarity to mammalian cysteine-rich secretory proteins, wasp venom antigen 5, and plant group 1 pathogenesis-related proteins[J]. Gene, 1997,191(2): 135-141.
- [56] Olson J H, Xiang X, Ziegert T, et al. Allurin, a 21-kDa sperm chemoattractant from *Xenopus* egg jelly, is related to mammalian sperm-binding proteins[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001,98(20): 11 205-11 210.
- [57] Ookuma S, Fukuda M, Nishida E. Identification of a DAF-16 transcriptional target gene, *scl-1*, that regulates longevity and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*[J]. Curr Biol, 2003, 13(5): 427-431.
- [58] Mochca-Morales J, Martin B M, Possani L D. Isolation and characterization of helothermine, a novel toxin from *Heloderma horridum horridum* (Mexican beaded lizard) venom[J]. Toxicon, 1990, 28(3): 299-309.
- [59] Milne T J, Abbenante G, Tyndall J D A, et al. Isolation and characterization of a cone snail protease with homology to CRISP proteins of the pathogenesis-related protein superfamily[J]. J Biol Chem, 2003,278(33): 31 105-31 110.
- [60] Morrissette J, Kratzschmar J, Haendler B, et al. Primary structure and properties of helothermine, a peptide toxin that blocks ryanodine receptors[J]. Biophys J, 1995,68(6): 2 280-2 288.
- [61] Yamazaki Y, Koike H, Sugiyama Y, et al. Cloning and characterization of novel snake venom proteins that block smooth muscle contraction[J]. Eur J Biochem, 2002,269(11): 2 708-2 715.
- [62] Brown R L, Haley T L, West K A, et al. Pseudochetoxin: a peptide blocker of cyclic nucleotide-gated ion channels[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999,96(2): 754-759.
- [63] Wang J, Shen B, Guo M, et al. Blocking effect and crystal structure of natrin toxin, a cysteine-rich secretory protein from *Naja atra* venom that targets the BKCa channel[J]. Biochemistry, 2005, 44(30): 10 145-10 152.
- [64] Wang F, Li H, Liu M N, et al. Structural and functional analysis of natrin, a venom protein that targets various ion channels[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006,351(2): 443-448.
- [65] Guo M, Teng M, Niu L, et al. Crystal structure of the cysteine-rich secretory protein steerisp reveals that the cysteine-rich domain has a K⁺ channel inhibitor-like fold[J]. J Biol Chem, 2005,280(13): 12 405-12 412.
- [66] Shikamoto Y, Suto K, Yamazaki Y, et al. Crystal structure of a CRISP family Ca²⁺-channel blocker derived from snake venom[J]. J Mol Biol, 2005, 350(4): 735-743.
- [67] Pungercar J, Krizaj I. Understanding the molecular mechanism underlying the presynaptic toxicity of secreted phospholipases A2[J]. Toxicon, 2007,50(7): 871-892.
- [68] Tsetlin V I, Karlsson E, Utkin Y N, et al. Interaction surfaces of neurotoxins and acetylcholine receptor[J]. Toxicon, 1982,20(1): 83-93.
- [69] Martin B M, Chibber B A, Maelicke A. The sites of neurotoxicity in alpha-cobratoxin[J]. J Biol Chem, 1983,258(14): 8 714-8 722.
- [70] Juan H F, Hung C C, Wang K T, et al. Comparison of three classes of snake neurotoxins by homology modeling and computer simulation graphics[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 257(2): 500-510.
- [71] Tsernoglou D, Petsko G A. The crystal structure of a post-synaptic neurotoxin from sea snake at A resolution[J]. FEBS Lett, 1976,68(1): 1-4.
- [72] Low B W, Preston H S, Sato A, et al. Three dimensional structure of erabutoxin b neurotoxic protein: inhibitor of acetylcholine receptor[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976,73(9): 2 991-2 994.
- [73] Bourne Y, Talley T T, Hansen S B, et al. Crystal structure of a Cbtx-AChBP complex reveals essential interactions between snake alpha-neurotoxins and nicotinic receptors[J]. EMBO J, 2005,24(8): 1 512-1 522.
- [74] Lou X, Liu Q, Tu X, et al. The atomic resolution crystal structure of atratoxin determined by single wavelength anomalous diffraction phasing[J]. J Biol Chem, 2004,279(37): 39 094-39 104.
- [75] Lou X, Tu X, Pan G, et al. Purification, N-terminal sequencing, crystallization and preliminary structural determination of atratoxin-b, a short-chain alpha-neurotoxin from *Naja atra* venom[J]. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2003,59(Pt 6): 1 038-1 042.
- [76] Tu X, Huang Q, Lou X, et al. Purification, N-

- terminal sequencing, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of atratoxin, a new short-chain alpha-neurotoxin from the venom of *Naja naja atra*[J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2002, 58(Pt 5): 839-842.
- [77] Xu G, Ulrichs H, Vauterin S, et al. How does agkicetin-C bind on platelet glycoprotein Ibalpha and achieve its platelet effects[J]. *Toxicon*, 2005, 45(5): 561-570.
- [78] Zhang H, Yang Q, Sun M, et al. Hydrogen peroxide produced by two amino acid oxidases mediates antibacterial actions[J]. *J Microbiol*, 2004, 42(4): 336-339.
- [79] Xu G, Teng M, Niu L, et al. Purification, characterization, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of two novel C-type lectin-like proteins: Aall-A and Aall-B from *Deinagkistrodon acutus* venom[J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2004, 60(Pt 11): 2 035-2 037.
- [80] Zang J, Teng M, Niu L. Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of AHP IX-bp, a zinc ion and pH-dependent coagulation factor IX binding protein from *Agkistrodon halys Pallas* venom [J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2003, 59(Pt 4): 730-733.
- [81] Liu S, Zhu Z, Sun J, et al. Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of agkaggregin, a C-type lectin-like protein from *Agkistrodon acutus* venom[J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2002, 58(Pt 4): 675-678.
- [82] Rong H, Li Y, Lou X, et al. Purification, partial characterization, crystallization and preliminary X-ray diffraction of a novel cardiotoxin-like basic protein from *Naja naja atra* (South Anhui) venom [J]. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2007, 63(Pt 2): 130-134.
- [83] Zhang H, Teng M, Niu L, et al. Purification, partial characterization, crystallization and structural determination of AHP-LAAO, a novel L-amino-acid oxidase with cell apoptosis-inducing activity from *Agkistrodon halys pallas* venom[J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2004, 60(Pt 5): 974-977.
- [84] Shikamoto Y, Morita T, Fujimoto Z, et al. Crystal structure of Mg^{2+} - and Ca^{2+} -bound Gla domain of factor IX complexed with binding protein[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(26): 24 090-24 094.
- [85] Fukuda K, Doggett T, Laurenzi I J, et al. The snake venom protein botrocetin acts as a biological brace to promote dysfunctional platelet aggregation [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2005, 12(2): 152-159.