

蓖麻毒素结构及其活性检测方法研究进展

刘宁, 张柏林*, 窦全丽, 王双双 (遵义师范学院生物与农业科技学院, 贵州遵义 563006)

摘要 对蓖麻毒素结构及活性检测方法进行综述, 从而为蓖麻毒素的深入研究、选择合适的蓖麻毒素活性测定方法提供理论依据。**关键词** 蓖麻; 蓖麻毒素; 结构; 活性检测**中图分类号** S565.6 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)18-0033-03**Researches Advances of Ricin Structure and the Detection Methods of Its Activity**

LIU Ning, ZHANG Bo-lin, DOU Quan-li et al (Department of Agricultural and Biotechnology of Zunyi Normal College, Zunyi, Guizhou 563006)

Abstract This paper reviewed the structure of ricin and its detection methods, and provided the basis for furtherly researching the ricin and selecting suitable methods for measuring ricin activity.**Key words** Ricin; Structure; Activity detection

蓖麻是大戟科蓖麻属植物, 为含油量较高的油料作物^[1]。但蓖麻植株的茎、叶或蓖麻的籽实中含有有毒物质, 主要包括蓖麻毒素、蓖麻碱、蓖麻反应原及蓖麻血球凝集素等^[2]。其中, 蓖麻毒素也称蓖麻毒蛋白, 是迄今所知毒性最强的植物毒蛋白, 毒性约是氰化物的 6 000 倍^[3]。蓖麻毒素主要存在于蓖麻蛋白中, 在干燥种子、脱脂籽实及幼嫩新鲜茎叶中含量分别达 3.3%、2.0%~3.0% 及 0.7%~1.0%。蓖麻毒素为白色粉末或结晶固体, 在 25 ℃ 时, 可在较大范围的酸碱溶液中反复结冰和溶解, 但其毒性仍保持不变^[4]。因此, 建立蓖麻毒素快速、准确、灵敏的检测方法引起了国内外学者的广泛关注。笔者对蓖麻毒素结构及检测方法进行综述, 以期选择合适的蓖麻毒素检测方法及研究蓖麻毒素新的检测技术提供参考。

1 蓖麻毒素的结构

蓖麻毒素(约占蓖麻蛋白的 5%, 分子量约为 66 kD)是一种 II 型异二聚体核糖体失活蛋白, 由核糖体失活酶(蓖麻毒素 A 链)及与半乳糖/N-乙酰半乳糖胺特异结合的凝集素(蓖麻毒素 B 链)组成, 二者之间连接一个二硫键^[5-7](图 1)。对蓖麻毒素的一级结构进行分析发现, A 链含有 267 个氨基酸残基, 分子量约为 32 kD, 具有催化活性, 是蓖麻毒素蛋白的效应链。A 链中 N 端第 4 位及 C 端附近分别含有 1 个赖氨酸(Lys)残基, 是蓖麻毒素 A 链毒性作用的关键中心。B 链具有 2 个结构域, 这 2 个结构域具有同源性, 由基因复制产生。结构域 1 中含有氨基末端, 而结构域 2 中含有羧基末端。蓖麻毒素 B 链由 267 个氨基酸残基组成, 具有结合活性, 是蓖麻毒素的结合链^[6,8]。

1.1 A 链结构 蓖麻毒素 A 链为球形, 含有 8 个 α 螺旋及 8

个 β -折叠片层。核糖体失活蛋白家族均存在固定的 8 个氨基酸序列, 这些氨基酸序列均存在于其活性位点中, 包括酪氨酸 80、酪氨酸 123、谷氨酸 177、精氨酸 180、色氨酸 211^[9-11]。其中, 精氨酸 180 与 N3 结合, 而谷氨酸 177 位于核糖体附近^[6]。Day 等^[12]研究表明, 谷氨酸 177 和精氨酸 180 对 A 链的活性有很大影响, 若其中一个发生突变, A 链的活性则受到较大影响, 说明氨基酸的保守对其活性发挥具有重要作用。

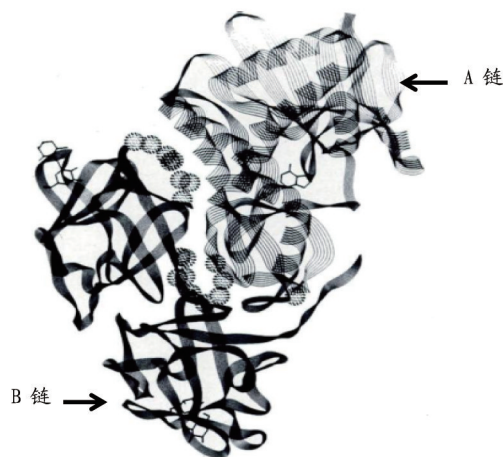


图 1 蓖麻毒素的结构

Fig.1 Structure of ricin

蓖麻毒素的 A 链除具有钝化核糖体的功能外, 也具有催化活性^[13-14]。A 链是一种能从 28S 核糖体 RNA 中脱去腺嘌呤的糖苷酶, 毒素本身不能破坏 RNA 链的活性, 即使在碱性环境和有苯胺存在的酸性环境下, 脱嘌呤作用仍非常敏感^[15]。蓖麻毒素 A 链的酶活性很高, 一分子蛋白在 1 min 内可以钝化几千个核糖体, 远超过细胞的再生速度, 可以杀死多个动物细胞^[16]。

1.2 B 链结构 蓖麻毒素 B 链呈哑铃状, 含 2 个半乳糖结合位点, 能与细胞膜表面的半乳糖/N-乙酰半乳糖胺特异性结合^[17]。B 链与 β -D-半乳糖结合, 且折叠成 2 个球形, 每个含有 1 个结合位点。一般 B 链组成上有一系列的基因重复, 它们都是由 3 种遗传性的半乳糖结合肽段 α 、 β 和 γ 组成, 其

基金项目 遵义师范学院博士启动基金项目(遵师 BS[2015]11 号); 贵州省教育厅青年科技人才成长项目(黔教合 KY 字[2016]258); 贵州省科技厅计划项目(黔科合基础 2017[1205]); 贵州省高层次人才项目(遵师科合人才[2017]10 号); 贵州省科技厅联合基金项目(黔科合 J 字 LKXS[2014]04 号)。

作者简介 刘宁(1985—), 女, 山东德州人, 助理实验师, 硕士, 从事饲料抗营养因子研究。* 通讯作者, 副教授, 博士, 从事动物营养与生理调控研究。

收稿日期 2018-04-30

中只有 1α 和 2γ 能与半乳糖结合,通常与糖蛋白、糖脂上的碳水化合物配位子结合,因此一般在细胞上有成千上万的结合位点^[18]。但当 2 个球形都发生突变时,蓖麻毒素 B 链则会失去活性,无法与细胞发生凝集。蓖麻毒素 B 链单个氨基酸的改变可能影响其与受体的结合。研究表明,将蓖麻毒素 B 链 255 位的天冬酰胺换成丙氨酸,尽管其仍能与 A 链以二硫键连接,且具有相似的分子量,但与野生型的 B 链相比,其凝集活性降低了 99%^[19]。蓖麻毒素 B 链单独存在时无毒性,只有在结合半乳糖/N-乙酰基半乳糖胺时才发挥毒性。蓖麻毒素 B 链毒性作用的发挥可能由以下原因引起:①RTB 链可与细胞表面的半乳糖或甘露糖的受体结合,使 A 链进入细胞内,从而产生毒性作用;②蓖麻毒素 B 链与半乳糖残基结合后,经逆向转运作用将蓖麻毒素运输到内质网,然后释放出具有酶活性的 A 链,进而发挥毒性作用^[20]。

2 蓖麻毒素的检测方法

蓖麻毒素具有很强的毒性作用,毫克级的剂量即可致人或动物死亡^[21]。但截至目前,适用于人的解毒药和特异性抗毒素特效药尚未被研制出来。因此,建立快速有效的检测方法成为国内外学者研究的热点。根据蓖麻毒素的理化性质、生物化学特性及免疫学特性,建立了免疫吸收分析、生物传感器分析及生物质谱分析等方法。

2.1 免疫标记分析法 免疫标记方法是将抗原或抗体进行生物学标记,利用蓖麻毒素抗原位点能与抗体发生特异性结合的特点而建立的检测方法,是检测蓖麻毒素最常用的技术手段^[22-23]。常用的免疫抗体标记方法有酶联免疫吸附法、胶体金标记法及放射免疫法。Poli 等^[22]利用自制的抗体(以羊为抗体制备动物制得)进行研究,结果表明,ELISA 方法可检测到生物样品中微克级的蓖麻毒素。王宗义等^[24]通过进一步研究,建立了夹心 ELISA 方法,检出限可达 2.5 ng/mL。

早期酶联免疫吸附法主要采用多克隆抗体,可能存在一定程度上的交叉反应,影响检测结果的精确性。而单克隆抗体是利用某一抗原表位为抗体,具有特异性较高的特点。因此,以单克隆抗体为基础的蓖麻毒素检测方法,是快速、灵敏、经济、实用的定量检测方法。刘文森^[25]利用胶体金技术标记所制备的单克隆抗体,进行检测试剂条的制备。结果表明,随着蓖麻毒素浓度的增加,胶体金试剂条的颜色逐渐减弱,试剂条的检测灵敏度可达 10 $\mu\text{g/mL}$,满足检测需求。

2.2 放射免疫检测法 随着生物标记技术的进一步发展,研究者成功建立了放射免疫检测方法。该方法主要是利用抗原-抗体特异性结合而进行体外超微量蓖麻毒素检测,具有高度灵敏性、精确性的特点。放射免疫方法可检测出样品中 100 pg 数量级的蓖麻毒素^[26],适用于对蓖麻毒素中毒者血液中蓖麻毒素含量的检测。但该方法的缺点是操作处理比较繁琐,对设备的要求比酶联免疫法高,且对人员的专业性要求较高及放射元素的处理等条件限制了该方法的广泛应用^[27]。

2.3 高效液相色谱法 高效液相色谱检测将待测物质溶于流动相中,利用色谱柱固定相将流动相的组成进行分离,对

检测器收集到的峰信号转换为待测物质浓度,进而判定待测物质含量的一种方法,具有速度快、分辨率高、灵敏度高等特点^[28]。刘文森^[25]采用 PROTEIN KW-802.5 凝胶色谱柱,在柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ 、流速 1 mL/min、进样量 10 μL 的条件下进行蓖麻毒素检测条件的建立。结果发现,蓖麻毒素在波长 280 nm 条件下具有最大的吸收峰,出峰时间约为 8.96 min,在 0.093~5.970 μg 具有良好的线性关系,最低检测限达 23.33 ng。

2.4 生物传感法 生物传感器是将生物技术和电子技术联合使用,将待测物与识别元件特异性结合后产生的生物敏感物质的化学信号转变为电信号、光信号等,从而达到分析检测目的^[8]。该方法无需特殊标记物,具有选择性好、操作简单、实时在线监测的特点,是医学诊断、食品卫生检验等领域安全快速检测的研究热点^[29]。刘冰等^[29]利用压电免疫传感进行蓖麻毒素检测,结果表明,该方法对蓖麻毒素具有较高的灵敏度检测范围,可达 0.50~10.0 mg/L。随着量子点的发展,免疫传感检测技术得到进一步发展。Goldman 等^[30]基于量子点技术进一步研究发现,蓖麻毒素的检测极限值可达 30 ng/mL。

2.5 生物质谱技术 基质辅助激光解吸/电离(MALDI)及电喷雾等技术为分析极性、难挥发等特点的生物样品提供了可靠条件^[31]。肽质量指纹谱(peptide mass fingerprinting, PMF)是利用特异性蛋白酶对不同蛋白质一级结构进行水解处理后得到具有独特特征的肽混合物,称其为指纹谱。该方法是目前进行蛋白质鉴定的常用方法^[32]。将待测蛋白质样品经垂直板电泳或二维电泳分离,经酶切、肽段提取后,将所得的肽段混合物进一步分离,通过电喷雾-质谱技术在线测定蛋白质的肽谱,从而实现鉴定。该方法不需要进行肽混合物的分离,具有操作简单、分析快速及灵敏度高的特点^[31]。闫妍^[31]将分离后的蓖麻毒素凝胶进行酶切和肽片段提取后,对所得的肽混合物进行 MALDI-TOF 质谱分析,将所测肽片段的质谱数据在 SwissProt 或 NCBI nr 数据库进行 PMF 检索比对,得到蓖麻毒素的序列覆盖率达 35%。

3 小结

由于蓖麻毒素具有较强的毒性,且可能作为重要的生物恐怖战剂毒素被应用于战争中,受到各国政府及科研工作者的重视。因而,建立快速、准确的测定方法,以便为疑似样品及中毒人员进行快速检测及治疗提供技术支持。目前蓖麻毒素检测方法较多,应用也较广泛,但尚存在一定的不足:①免疫标记及放射免疫方法具有检测灵敏度高的特点,但其对于相对繁杂的抗体制备及特殊标记物的要求,限制了该方法的大量推广应用;②生物传感法及生物质谱法,虽然借助于高科技的仪器设备,具有灵敏度高的特点,但高昂的仪器设备使得检测费用大大增加,不适合做现场检测。因此,建立快速、准确的试剂条检测方法,以便应对紧急检测及现场检测的需求,将成为蓖麻毒素检测方法的研究重点,从而为临床治疗提供理论依据。

参考文献

- [1] EHRlich P. Experimentelle Untersuchungen über Immunität. II. Ueber Abrin[J]. Dtsch Med Wochenschr, 2000,17(44):1218-1219.
- [2] 刘林娜. 蓖麻毒素毒性作用及与小肠刷状缘膜蛋白互作组分的筛选

- [D].长春:吉林大学, 2009.
- [3] 陈宁庆.实用生物毒素学[M].北京:中国科学技术出版社,2010.
- [4] ENDO Y, TSURUGI K.RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes[J]. Journal of biological chemistry, 1987, 262(17): 8128-8130.
- [5] HEGDE R, PODDER S K.Studies on the variants of the protein toxins ricin and abrin[J]. Eur J Biochem, 1992, 204(1): 155-164.
- [6] LORD J M, ROBERTS L M, ROBERTUS J D.Ricin; Structure, mode of action, and some current applications[J]. The FASEB Journal, 1994, 8(2): 201-208.
- [7] 马小溪, 刘合珠, 唐吉军, 等. 3种酶联免疫分析法在蓖麻毒素定量测定中的比较[J]. 分析化学, 2011, 39(5): 685-689.
- [8] 邢丽杰.蓖麻毒素免疫检测方法的建立及 RTB 的融合表达与抗原性分析[D].石河子:石河子大学, 2008.
- [9] MARSDEN C J, FÜLÖP P V, DAY P J, et al.The effect of mutations surrounding and within the active site on the catalytic activity of ricin A chain[J]. The FEBS Journal, 2004, 271(1): 153-162.
- [10] READY M P, KIM Y, ROBERTUS J D.Site-directed mutagenesis of ricin A-chain and implications for the mechanism of action[J]. Proteins-structure function & bioinformatics, 1991, 10(3): 270-278.
- [11] SCHLOSSMAN D, WITHERS D, WELSH P, et al.Role of glutamic acid 177 of the ricin toxin A chain in enzymatic inactivation of ribosomes[J]. Molecular & cellular biology, 1989, 9(11): 5012-5021.
- [12] DAY P J, ERNST S R, FRANKEL A E, et al.Structure and activity of an active site substitution of ricin A chain[J]. Biochemistry, 1996, 35(34): 11098-11103.
- [13] OLSNES S, PIHL A.Isolation and properties of abrin; A toxic protein inhibiting protein synthesis[J]. The FEBS Journal, 1973, 35(1): 179-185.
- [14] MONTANARO L, SPERTI S, STIRPE F.Inhibition by ricin of protein synthesis *in vitro*. Ribosomes as the target of the toxin[J]. Biochemical journal, 1973, 136(3): 677-683.
- [15] OGASAWARA T, SAWASAKI T, MORISHITA R, et al.A new class of enzyme acting on damaged ribosomes: Ribosomal RNA apurinic site specific lyase found in wheat germ[J]. EMBO J, 1999, 18(22): 6522-6531.
- [16] EIKLID K, OLSNES S, PIHL A.Entry of lethal doses of abrin, ricin and modeccin into the cytosol of HeLa cells[J]. Experimental cell research, 1980, 126(2): 321-326.
- [17] 董巨莹.蓖麻毒素的毒作用及其信号转导的分子机理研究[D].西安: 第四军医大学, 1999.
- [18] SPHYRIS N, LORD J M, WALES R, et al.Mutational analysis of the Ricinus lectin B-chains.Galactose-binding ability of the 2 gamma subdomain of Ricinus communis agglutinin B-chain[J]. Journal of biological chemistry, 1995, 270(35): 20292-20297.
- [19] VITETTA E S, YEN N.Expression and functional properties of genetically engineered ricin B chain lacking galactose-binding activity[J]. Biochim Biophys Acta, 1990, 1049(2): 151-157.
- [20] 许娜.重组蓖麻毒素B链调节免疫细胞活化及其对信号传导通路的影响[D].长春:吉林大学, 2013.
- [21] 唐吉军.生物活性分子检测新方法的研究[D].北京:中国人民解放军军事医学科学院, 2011.
- [22] POLI M A, RIVERA V R, HEWETSON J F, et al.Detection of ricin by colorimetric and chemiluminescence ELISA[J]. Toxicon, 1994, 32(11): 1371-1377.
- [23] SHYU R H, SHYU H F, LIU H W, et al.Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of ricin[J]. Toxicon, 2002, 40(3): 255-258.
- [24] 王宗义, 贺平丽, 张丽英, 等.夹心 ELISA 快速检测蓖麻粕中残留的蓖麻毒素[J]. 饲料工业, 2006, 27(17): 30-32.
- [25] 刘文森.蓖麻毒素单抗克隆抗体制备、检测方法以及单链抗体研究[D].北京:中国人民解放军军事医学科学院, 2010.
- [26] 贾茗娟, 尹惠琼, 王跃华, 等.蓖麻毒素检测技术研究进展[J]. 生物技术通讯, 2011, 22(5): 747-750.
- [27] 郎立伟, 王玉霞.蓖麻毒素检测方法研究进展[J]. 军事医学, 2009, 33(6): 573-576.
- [28] 李永波.高效液相色谱电化学发光传感器新技术及气质联用方法研究和应用[D].西安:陕西师范大学, 2013.
- [29] 刘冰, 董朝阳, 田艳慧, 等.压电免疫传感器法检测蓖麻毒素[J]. 分析化学, 2006, 34(12): 1779-1782.
- [30] GOLDMAN E R, GLAPP A R, ANDERSON G P, et al.Multiplexed toxin analysis using four colors of quantum dot fluororeagents[J]. Analytical chemistry, 2004, 76(3): 684-688.
- [31] 闫妍.蓖麻毒素和相思子毒素的提取纯化及基于生物质谱技术鉴定方法的建立[D].北京:中国人民解放军军事医学科学院, 2005.
- [32] 钱小红, 谢剑伟.现代仪器分析在生物医学研究中的应用[M].北京:化学工业出版社, 2003.

(上接第 32 页)

- [69] HELM K W, SCHMEITS J, VIERLING E. An endomembrane-localized small heat-shock protein from *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant physiology, 1995, 107(1): 287-288.
- [70] 郭鹏.甜椒细胞质小分子量热激蛋白基因的表达及其在温度逆境下的功能分析[D].泰安:山东农业大学, 2007.
- [71] CHAKRABORTY K, BISHI S K, SINGH A L, et al.Rapid induction of small heat shock proteins (sHSP) improves physiological adaptation to high temperature stress in peanut [J/OL]. Journal of agronomy & crop science, 2017[2018-01-20]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jac.12260>.
- [72] ZHANG Y Z, CHENG Y W, YA H Y, et al.Identification of heat shock proteins via transcriptome profiling of tree peony leaf exposed to high temperature[J]. Genetics & molecular research, 2015, 14(3): 8431-8442.
- [73] ZHU B, CHOI D W, FENTON R, et al.Expression of the barley dehydrin multigene family and the development of freezing tolerance[J]. Molecular & general genetics, 2000, 264(1/2): 145-153.
- [74] GUSTA L V, WILEN R W, FU P.Low-temperature stress tolerance: The role of abscisic acid, sugars, and heat-stable proteins[J]. Hortscience, 1996, 31(1): 39-46.
- [75] DING C K, WANG C Y, GROSS K C, et al.Reduction of chilling injury and transcript accumulation of heat-shock proteins in tomato fruit by methyl jasmonate and methyl salicylate[J]. Plant science, 2001, 161(6): 1153-1159.
- [76] 王丽, 赵春梅, 王义菊, 等.过量表达叶绿体小分子热激蛋白提高番茄的抗寒性[J]. 植物生理与分子生物学报, 2005, 31(2): 167-174.
- [77] UKAJI N, KUWABARA C, TAKEZAWA D, et al.Accumulation of small heat-shock protein homologs in the endoplasmic reticulum of cortical parenchyma cells in mulberry in association with seasonal cold acclimation[J]. Plant physiology, 1999, 120(2): 481-490.
- [78] COLLINS G G, NIE X L, SALTVEIT M E.Heat shock proteins and chilling sensitivity of mung bean hypocotyls[J]. Journal of experimental botany, 1995, 46(288): 795-802.
- [79] SABEHAT A, WEISS D, LURIE S.The correlation between heat-shock protein accumulation and persistence and chilling tolerance in tomato fruit[J]. Plant physiology, 1996, 110(2): 531-537.
- [80] SUN W, BERNARD C, VAN DE COTTE B, et al.At-HSP17.6A, encoding a small heat-shock protein in *Arabidopsis*, can enhance osmotolerance upon overexpression[J]. Plant journal for cell & molecular biology, 2001, 27(5): 407-415.
- [81] MU C J, ZHANG S J, YU G Z, et al.Overexpression of small heat shock protein LimHSP16.45 in *Arabidopsis* enhances tolerance to abiotic stresses[J]. PLoS One, 2013, 8(12): 1-9.
- [82] 玉晓红, 牛向丽, 刘永胜.植物小分子热激蛋白及其抗逆功能[J]. 基因组学与应用生物学, 2011, 30(39): 1250-1254.
- [83] WEHMEYER N, VIERLING E.The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance[J]. Plant physiology, 2000, 122(4): 1099-1108.
- [84] LI Z Y, LONG R C, ZHANG T J, et al.Molecular cloning and characterization of the MsHSP17.7 gene from *Medicago sativa* L.[J]. Molecular biology reports, 2016, 43(8): 815-826.
- [85] ZHAO C M, SHONO M, SUN A Q, et al.Constitutive expression of an endoplasmic reticulum small heat shock protein alleviates endoplasmic reticulum stress in transgenic tomato[J]. Journal of plant physiology, 2007, 164(7): 835-841.