



A型肉毒毒素轻链胞内滞留模型的建立

高洁, 王建新, 南楠, 官赛赛, 李涛, 王慧*

军事科学院军事医学研究院微生物流行病学研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071

摘要: 【目的】建立A型肉毒毒素轻链胞内滞留模型来模拟A型肉毒毒素引起的长期中毒。【方法】设计构建pcDNA3.1-ALC-GFP重组质粒, 提取质粒进行PCR验证, 并将其转染进Nureo-2a细胞中表达, 利用Western Blot与细胞免疫荧光分析验证ALC-GFP的表达情况及其在细胞内的长时间滞留, 建立A型肉毒毒素轻链的胞内滞留模型, 并将该模型用于抗肉毒药物的筛选。【结果】成功构建pcDNA3.1-ALC-GFP重组质粒并将其转染进Nureo-2a细胞中, 验证了ALC-GFP在细胞内具有长时间滞留性, 成功建立了A型肉毒毒素轻链胞内滞留模型, 并利用该模型筛选出潜在抗肉毒药物CB3。【结论】成功建立了A型肉毒毒素轻链胞内滞留模型, 并初步应用于CS1, CE2和CB3药物筛选, 为A型肉毒毒素长期中毒的解毒研究奠定了基础。

关键词: A型肉毒毒素, 轻链, Nureo-2a细胞, 滞留, 药物筛选

肉毒毒素(botulinum toxins, BoNTs)作为一类细菌蛋白外毒素^[1], 是由50 kDa的轻链(light chain, LC)和100 kDa的重链(heavy chain, HC)组成的150 kDa的生物大分子, 轻链和重链间由二硫键连接^[2]。结构上, 完整的成熟毒素包括3个结构域: N端轻链Zn²⁺金属蛋白酶活性结构域, 重链N端50 kDa跨膜转运结构域, 以及重链C端50 kDa受体结合域^[3-4]。导致肉毒中毒的方式具有多样性, 其中食物中毒最为常见, 除此之外, 也可能发生创伤性肉毒中毒、婴儿肉毒中

毒或其他原因不明的肉毒中毒^[5]。肉毒毒素毒性强^[6], 成人致死剂量只有ng/kg^[7], 且易于生产, 被美国CDC认为是潜在的生物武器。

肉毒毒素分为A-H八种血清型^[8-9], 其中A、B、E、F型能导致人类致病^[10]。肉毒毒素引起的中毒都是通过将LC蛋白传递到细胞质中, 在细胞质中特异性地切割3种可溶性NSF附着蛋白受体(soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor, SNARE)蛋白来毒害神经元的^[1-13], 其中A、E型肉毒毒素切割SNARE

*通信作者。Tel: +86-10-66948532; E-mail: geno0109@vip.sina.com

收稿日期: 2021-01-24; 修回日期: 2021-03-20; 网络出版日期: 2021-03-30

蛋白中的突触小体相关蛋白-25 (Synaptosome-associated protein of 25 kDa, SNAP-25), B、D、F、G 型肉毒毒素裂解突触小泡缔合型蛋白 (Vesicle-associated membrane protein/synaptobrevin, VAMP), C 型肉毒毒素会同时切割 SNAP25 和突出融合蛋白(syntaxin, Stx)。这些不同血清型的毒素在在中毒患者体内表现出不同的效力和持久性^[14], 到目前为止在人类和啮齿动物中的现有数据一致证明 A 型肉毒毒素引起的中毒持续时间最长^[15-18]。A 型肉毒毒素在体内长期滞留会引起机体机能的长时间破坏, 严重影响到机体的正常活动, 危害身体健康, 也是 A 毒治疗困难的重要原因。所以, 建立 A 型肉毒毒素的滞留模型, 对于研究肉毒毒素在体内长久滞留的原因, 寻找肉毒毒素的有效解毒药物具有重要意义。

到目前为止, 国内外研究工作者对于探究肉毒毒素的胞内滞留的防治开展了大量的工作^[19-25], 但是由于肉毒毒素毒性极强和现有的检测方法的灵敏度达不到检测毒素在体水平, 所以无法建立合适的动物模型用于胞内的滞留研究。其次由于肉毒毒素抗体种类较少, 且价格较贵, 也不适于在细胞水平上大规模直接检测天然毒素的滞留情况, 这也限制了毒素进入细胞后的实时滞留过程的直接观察。有研究报道利用荧光标记生物分子, 通过荧光效果来进行生物分子在细胞内的示踪, 并取得了突破性成果^[26-34], 为我们的研究提供了启发。

在这项研究中, 我们通过将 A 型肉毒毒素轻链 ALC 与绿色荧光蛋白基因(Green Fluorescent Protein, GFP)连接, 并构建到质粒 pcDNA3.1 上, 并将质粒 pcDNA3.1-ALC-GFP 其转染进毒素靶细胞 Nureo-2a 细胞中, 模拟 A 型肉毒毒素在体

内的中毒, 通过检测 ALC-GFP 表达后不同时间神经细胞内 ALC-GFP 蛋白含量变化, 及底物蛋白 SNAP-25 的切割情况, 建立了一种简易便捷的观测模型。此外, 我们利用该模型筛选了潜在的抗肉毒化合物, 成功的筛选到潜在的抗肉毒药物 CB3, 为研究 A 型肉毒毒素引起长期中毒的机制, 寻找相应的解毒方法奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞: Nureo-2a 细胞为本室保存。

1.1.2 主要试剂: DMEM 培养基购自 Gibco 公司; GFP 抗体、SNAP-25 抗体购自 CST 公司; ALC 抗体购买自 RD-SYSTEMS 公司; β -Actin 抗体、羊抗兔二抗、羊抗鼠二抗购自 TransGen 公司; 无内毒素质粒提取试剂盒、RNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒购自 TIANGEN 公司; Lipofectamine[®]2000 购自 Invitrogen 公司; Cycloheximide 抑制剂购自 MCE 公司; 高效 RIPA 组织/细胞裂解液购自 Solarbio 公司。

1.1.3 主要仪器: PCR 仪购自 Thermo scientific 公司; 细胞培养箱购自太仓市实验仪器厂; 倒置荧光显微镜购自 Olympus 公司; 凝胶图像分析仪购自 Bio-Rad 公司; 全自动酶联免疫检测仪购自 BioTek Gen5 公司; LightCycler[®] 96 荧光定量 PCR 仪购自 Roche 公司。

1.2 构建与鉴定 pcDNA3.1-ALC-GFP 重组质粒

将 GFP 连接在 ALC 的 N 端, 并插入到 pcDNA3.1 的 *Hin*1 II 和 *Bam*H I 位点, 设计 pcDNA3.1-ALC-GFP 重组质粒并送往北京天一辉远生物科技有限公司构建。收到构建好的菌株

后,对重组质粒菌株进行 PCR 验证。PCR 引物序列为 pEGFP-NF:5'-TgggAggTCTATATAAgCAgAg-3', pEGFP-NR:5'-CgTCgCCgTCCAgCTCgACCAg-3',由北京天一辉远生物科技有限公司合成。PCR 扩增体系为:菌液模板 1 μL ,上下游引物 0.5 μL , Dream Taq Green PCR Master Mix (2 \times) 15 μL ,去离子水 13 μL 。扩增条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。进行 1%琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯下检测 PCR 扩增产物。

1.3 无内毒素质粒提取

将构建好的菌株接种到氨苄抗性的 LB 培养基中培养,利用无内毒素质粒提取试剂盒提取 pcDNA3.1-ALC-GFP 重组质粒,然后进行 1%琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯下检测质粒提取效果,利用全自动酶联免疫检测仪在 280 nm 处测定重组质粒纯度与浓度。

1.4 ALC-GFP 胞内表达水平的检测

用胰酶消化传代培养的 Nureo-2a 细胞,进行细胞计数,并接种于 12 孔板中,在不含抗生素的完全培养基(10% FBS 牛血清,90% DMEM 培养基)中培养。培养 20 h 待细胞长满 70%–80% 时,将培养基更换成 DMEM,利用转染试剂 Lipofectamine[®]2000 进行转染。转染分为 3 组:细胞对照组,pcDNA3.1 空质粒组和 pcDNA3.1-ALC-GFP 重组质粒,检测 ALC-GFP 的 mRNA 表达水平与蛋白表达水平。对于每孔细胞,按照 4 μL 脂质体:1.6 μg 质粒的比例,分别用 100 μL 的 OPTI-MEMI 培养基稀释混匀。在 5 min 之内将脂质体与质粒混匀,静置孵育 20 min。在 12 孔板中加入脂质体-质粒复合物,在 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 细胞培养箱中培养 6 h 后,更换含 1%青霉

素-链霉素双抗的完全培养基,置于细胞培养箱中培养。

转染 24 h 后,Trizol 法提取细胞总 RNA,利用反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA,通过 LightCycler[®] 96 荧光定量 PCR 仪进行 RT-PCR,引物如表 1,以 β -actin 作为内参,进行 ALC-GFP 的 mRNA 表达水平的检测。

转染 24 h 后,利用倒置荧光显微镜进行荧光检测,通过免疫荧光分析细胞内 ALC-GFP 表达效果,然后用高效 RIPA 组织/细胞裂解液裂解细胞,收集样品进行 ALC-GFP 表达水平的检测。进行 SDS-PAGE 电泳,转膜至 PVDF 膜上,在含 5%脱脂牛奶的 PBS-T 中 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h,分别加入 1:1000 稀释的 GFP 抗体或 ALC 抗体,以 β -actin 作为内参,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日 1 \times PBS-T 10 min 洗涤 4 次,室温孵育 1:1000 稀释的山羊抗鼠、山羊抗兔二抗 1 h,用 1 \times PBS-T 10 min 洗涤 4 次,加入显色液显色,并利用 imageJ 软件进行蛋白表达水平检测。

1.5 A 型肉毒毒素轻链胞内滞留转染模型的建立

进行细胞转染实验,转染 12 h 后加入 Cycloheximide 抑制剂,终止蛋白合成,并以此时间点记为 0 h。分别于 0、12、24、48、72 h 通过免疫荧光分析 A 型肉毒毒素轻链的滞留效果;进行 Western Blot 检测不同时间点 ALC-GFP 蛋白的表达与 SNAP-25 蛋白的切割量,并利用 imageJ 软件分析 A 型肉毒毒素轻链胞内滞留转染模型的滞留效果与毒性。

1.6 潜在抗肉毒药物的筛选

进行细胞转染实验,转染 6 h 后加入 7.5 mmol/L 的潜在抗肉毒药物 CS1、CE2 和 CB3,转染 12 h 加入 Cycloheximide 抑制剂,终止蛋白

合成, 并以此时间点记为 0 h。分别于 0、36、72 h 通过免疫荧光分析 A 型肉毒毒素轻链的滞留效果; 进行 Western Blot 检测不同时间点 ALC-GFP 蛋白的表达, 并利用 imageJ 软件分析潜在抗肉毒药物 CS1、CE2 和 CB3 对 A 型肉毒毒素轻链的清除效果。

1.7 统计学分析

本研究中统计分析采用 GraphPad Prism 8 软件, *t* 检验进行差异分析。

2 结果和分析

2.1 重组质粒 pcDNA3.1-ALC-GFP 的鉴定

PCR 扩增目的片段后, 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 结果如图 1-A, 在 1579 bp 处有清晰的扩增条带, 与质粒大小相符, 鉴定重组质粒菌株构建成功。提取 pcDNA3.1-ALC-GFP 重组质粒后, 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 结果如图 1-B, 重组质

粒 3200 bp 处有明亮清晰的两条带, 包括开环状 DNA 和线状 DNA, 证明质粒提取成功。利用全自动酶联免疫检测仪测定质粒浓度为 2093 ng/ μ L, 纯度为 1.906, 在 1.8–2.0 之间, 符合质粒提取标准。

2.2 ALC-GFP 胞内表达水平的验证

ALC-GFP 转染进 Nureo-2a 细胞后, 用 Trizol 法提取总 RNA, 经过反转录与 RT-PCR, 结果如图 2-A, 同空细胞对照组和 pcDNA3.1 空质粒组对比, pcDNA3.1-ALC-GFP 组 mRNA 水平明显升高 ($P < 0.01$)。Western Blot 检测蛋白表达水平, 结果如图 2-B, 同空细胞对照组与 pcDNA3.1 空质粒组对比, pcDNA3.1-ALC-GFP 组的 GFP 蛋白和 ALC 蛋白表达水平均显著上调 ($P < 0.001$)。倒置荧光显微镜下观察, 结果如图 2-C, 明场条件下可观察到细胞形态, pcDNA3.1-ALC-GFP 组有明显荧光, 空质粒组没有荧光, 证明 ALC-GFP 表达成功。

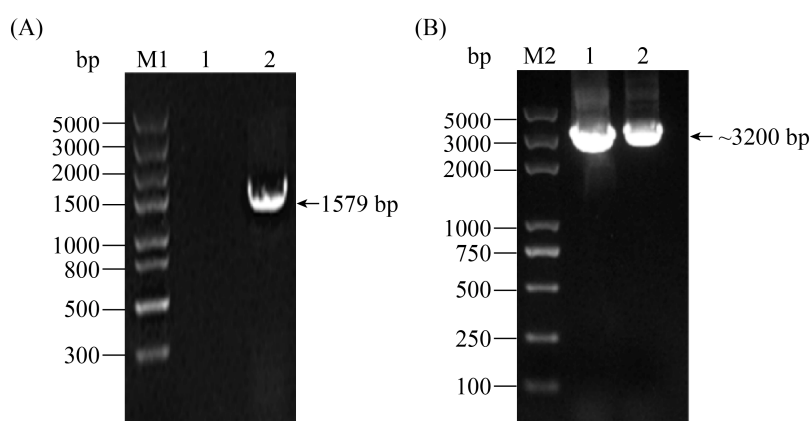


图 1. 重组质粒 pcDNA3.1-ALC-GFP 的鉴定与提取

Figure 1. Identification and extraction of recombinant plasmid pcDNA3.1-ALC-GFP. A: PCR analysis of ALC-GFP. M1: DL5000 DNA marker; lane 1: negative control; lane 2: PCR product of ALC-GFP gene. B: Extraction of recombinant plasmid pcDNA3.1-ALC-GFP. M1: DL5000 DNA marker; lane 1–2: analysis of extracted recombinant plasmid pcDNA3.1-ALC-GFP.

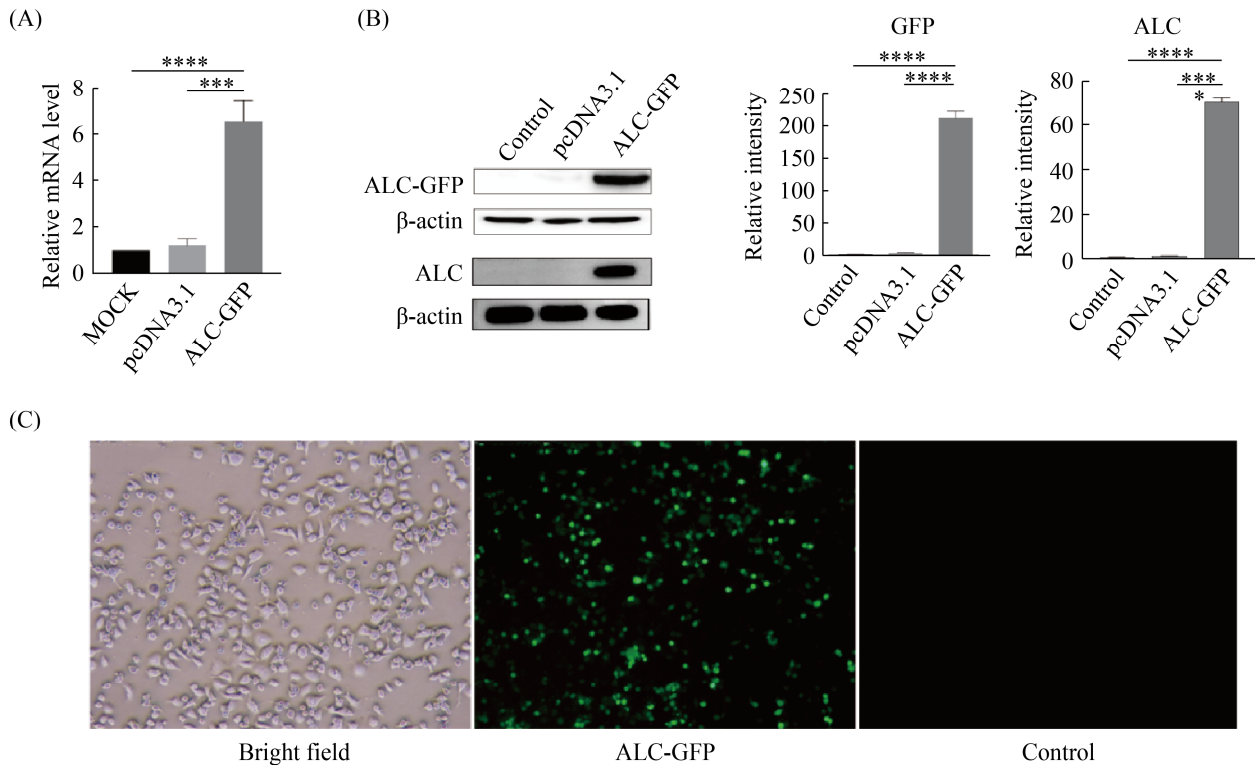


图 2. ALC-GFP 表达水平的验证

Figure 2. Verification of ALC-GFP expression level. A: The expression mRNA level of ALC-GFP were compared using the student's *t*-test. MOCK: control; pcDNA3.1: vector; ALC-GFP: pcDNA3.1-ALC-GFP. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$. B: Western blotting analysis of ALC-GFP protein expression level. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$; Mean \pm SD is represented by error bar. C: The expression of ALC-GFP was observed using fluorescence microscope.

2.3 A 型肉毒毒素轻链胞内滞留与毒性的检测

A 型肉毒毒素轻链胞内滞留转染模型的构建如图 3-A, 在转染 12 h 后将时间点记为 0 h, 分别于 0、12、24、48、72 h 通过 Western Blot 和倒置荧光显微镜评价肉毒毒素轻链的滞留效果。Western Blot 检测 ALC-GFP 蛋白表达水平, 结果如图 3-B, 随着时间的延长, ALC-GFP 蛋白表达水平无显著差异, 证明细胞内表达的 A 型肉毒毒素轻链在 72 h 内没有明显的降解与清除, 具有显著的滞留性。Western Blot 检测 ALC-GFP 蛋白毒性, 结果如图 3-B, 细胞内的 SNAP-25 蛋白随着

时间延长明显降低, 但是未进行 ALC-GFP 转染的对照组中, SNAP25 蛋白量无明显变化, 表明 ALC-GFP 蛋白在胞内持续存在导致了 SNAP25 蛋白量的降低, 发挥了毒性作用。倒置荧光显微镜下观察, 结果如图 3-C, 荧光强度几乎没有变化, 也证明 A 型肉毒毒素轻链在细胞内 72 h。

2.4 加快 A 型肉毒毒素轻链清除效果的潜在药物筛选

转染 6 h 后加入 7.5 mmol/L 的备选抗肉毒化合物 CS1、CE2 和 CB3, 12 h 后加入 Cycloheximide 抑制剂并以此时间点为 0 h, 分别于 0、36、72 h

收集样品, 通过 Western Blot 和荧光强度评价化合物的抗肉毒效果。Western Blot 检测蛋白的水平, 结果如图 4-A, 随着时间的延长, ALC-GFP 蛋白的量均有所降低, 其中化合物 CB3 对

ALC-GFP 作用效果明显($P < 0.001$)。倒置荧光显微镜下观察, 结果如图 4-B, 荧光强度随着时间延长逐渐降低, 证明化合物可能加快 A 型肉毒毒素轻链清除的效果。

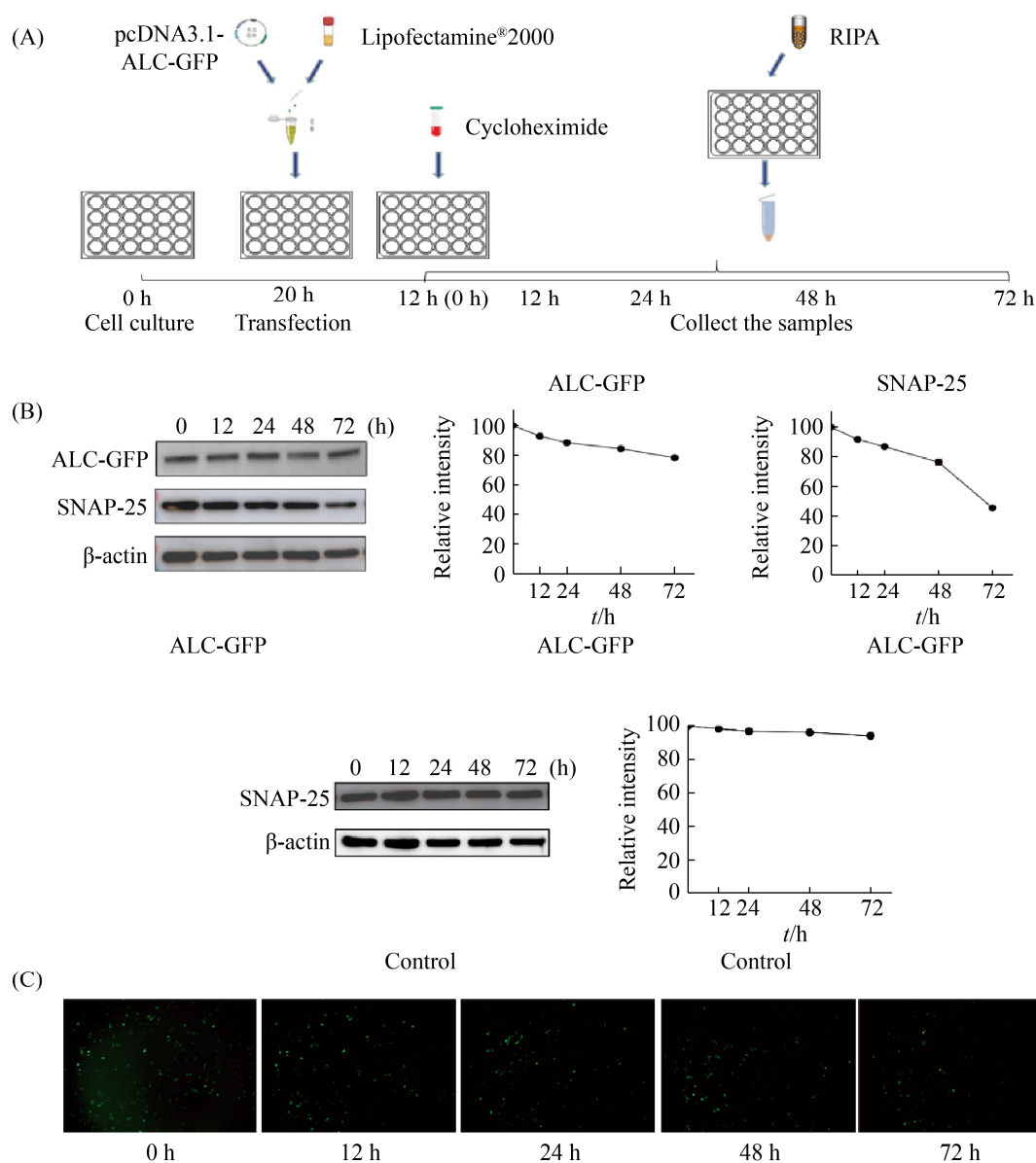


图 3. A 型肉毒毒素轻链胞内滞留与毒性的检测

Figure 3. Detection of intracellular persistence and toxicity of botulinum toxin type A light chain. A: schematic diagram of the the intracellular persistence model of light chain of botulinum toxin type A; B: western blotting analysis of the intracellular persistence and catalyst of botulinum toxin type A light chain; C: fluorescence evaluation of the intracellular persistence of botulinum toxin type A light chain.

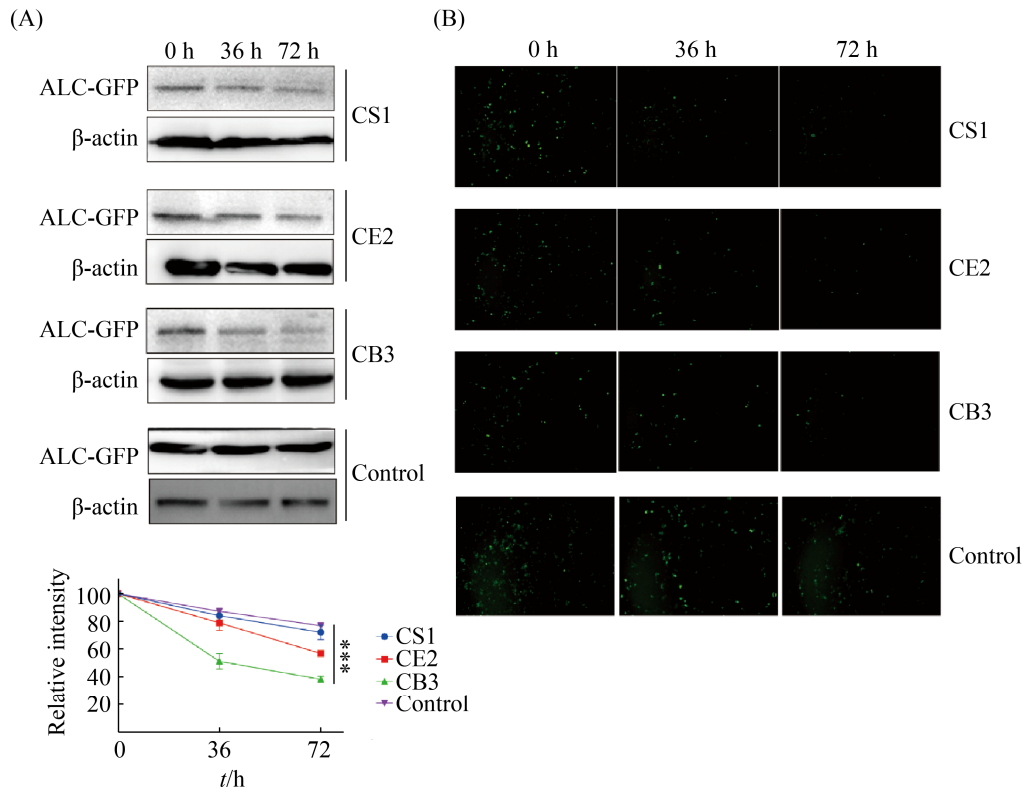


图 4. 抗肉毒化合物的筛选

Figure 4. Screening of anti-botulinum compounds. A: western blotting analysis of anti-botulinum effect of the CS1, CE2 and CB3. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$; Mean \pm SD is represented by error bar. B: fluorescence evaluation of anti-botulinum effect of the CS1, CE2 and CB3.

3 讨论

A 型肉毒毒素在体内长期滞留会严重影响到机体的正常活动, 危害身体健康, 所以建立 A 型肉毒毒素的滞留模型, 对于研究肉毒毒素在体内长久滞留的原因, 寻找肉毒毒素的有效解毒药物具有重要意义。本文我们通过将 A 型肉毒毒素轻链 ALC 与绿色荧光蛋白基因连接, 并构建到质粒 pcDNA3.1 上, 并将质粒 pcDNA3.1-ALC-GFP 其转染进毒素靶细胞 Nureo-2a 细胞中, 通过检测 ALC-GFP 表达后不同时间时神经细胞内 ALC-GFP 蛋白含量变化, 及底物蛋白 SNAP-25 的切割情况, 发现转染表达的 ALC-GFP 能够在

Nureo-2a 细胞中持续存在, 与天然毒素表现出相同的滞留特性, 表明了我们建立的 A 型肉毒毒素轻链胞内滞留模型能够模拟天然毒素的滞留特征, 并具备天然毒素的毒性。此外, 我们通过该模型筛选了潜在的抗肉毒化合物, 成功的筛选到潜在抗肉毒药物候选化合物分子 CB3, 为研究 A 型肉毒毒素引起长期中毒的机制, 寻找相应的解毒方法奠定了基础。

细胞模型是生物学研究中的一种强有力工具, 是模拟人与动物体内环境的基础模型, 对于研究毒素的致病机制具有重要价值。肉毒毒素具有多种血清型, 且不同血清型在体内的滞留时间不同, 其中 A 型肉毒毒素的滞留时间明显长于

其他血清型的毒素^[15], 所以构建 A 型肉毒毒素轻链胞内滞留模型对于研究 A 型肉毒毒素独特的体内滞留机制, 寻找有效的解毒方法具有重要意义。

目前我们建立的 A 型肉毒毒素轻链胞内滞留模型, 观察了 ALC-GFP 蛋白在 Nureo-2a 细胞 72 h 内的滞留过程, 验证了 A 型肉毒毒素在 72 h 内具有胞内滞留效果, 对于探索 A 型肉毒毒素的特殊滞留机制提供基础, 但是也存在有待解决的问题。根据 SNAP-25 切割数据, A 型肉毒毒素对胎儿小鼠脊神经细胞的中毒持续超过 11 周^[35], 但由于长时间的培养观察, Nureo-2a 细胞状态受到影响, 我们的模型观察时间仅有 72 h, 没有观测到完整 A 型肉毒毒素轻链胞内滞留周期, 接下来我们会继续筛选其他神经细胞, 满足实验观察时间的要求。另外, 我们加入了 3 种有可能成为抗肉毒药物的备选化合物, 用于抗肉毒药物的筛选, 有幸筛选出化合物 CB3, 发现其具有降低 A 型肉毒毒素滞留的作用, 但其最终是否能成为抗肉毒药物, 需要进一步探索研究。

本研究建立起一个较为完善的肉毒毒素轻链胞内滞留模型, 研究 A 型肉毒毒素在体内的长期滞留, 有助于我们了解肉毒长期中毒在不同时间对机体造成的影响, 判断肉毒中毒的具体时期, 并对应不同时期寻找最有效的解毒方法。此外, 我们利用该模型筛选可能成为抗肉毒药物的备选化合物, 为以后研究肉毒毒素的长期中毒与抗肉毒药物的评价提供了一个新的平台, 对于新的解毒机制的研究也有一定参考价值。目前有大量的研究应用肉毒毒素来进行医疗研究^[10], 其中之一是美容行业^[13], 利用肉毒毒素的长期滞留特点来维持容颜美丽, 也有研究利用其持续麻痹神

经减缓疼痛的特点来治疗疾病^[11-12,36], 建立 A 型肉毒毒素的滞留模型, 对于评价肉毒毒素的安全有效期也提供了方向。

参考文献

- [1] Peck MW. Biology and genomic analysis of *Clostridium botulinum*. *Advances in Microbial Physiology*, 2009, 55: 183–320.
- [2] Rossetto O, Montecucco C. Presynaptic neurotoxins with enzymatic activities *Pharmacology of Neurotransmitter Release*, 2008(184): 129–170. DOI: 10.1007/978-3-540-74805-2_6.
- [3] Lacy DB, Stevens RC. Sequence homology and structural analysis of the clostridial neurotoxins. *Journal of Molecular Biology*, 1999, 291(5): 1091–1104.
- [4] Swaminathan S, Eswaramoorthy S. Structural analysis of the catalytic and binding sites of *Clostridium botulinum* neurotoxin B. *Nature Structural Biology*, 2000, 7(8): 693–699.
- [5] Ambrožová H. Botulism - a rare but still present, life-threatening disease. *Epidemiologie Mikrobiologie Immunologie*, 2019, 68(1): 33–38.
- [6] Gill DM. Bacterial toxins: a table of lethal amounts. *Microbiological Reviews*, 1982, 46(1): 86–94.
- [7] Rossetto O, Pirazzini M, Montecucco C. Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(8): 535–549.
- [8] Hackett G, Moore K, Burgin D, Hornby F, Gray B, Elliott M, Mir I, Beard M. Purification and characterization of recombinant botulinum neurotoxin serotype FA, also known as serotype H. *Toxins*, 2018, 10(5): 195.
- [9] Smith TJ, Hill KK, Raphael BH. Historical and current perspectives on *Clostridium botulinum* diversity. *Research in Microbiology*, 2015, 166(4): 290–302.
- [10] Arnon SS, Schechter R, Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, Fine AD, Hauer J, Layton M, Lillibridge S, Osterholm MT, O'Toole T, Parker G, Perl TM, Russell PK, Swerdlow DL, Tonat K, Biodefense WGO. Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA*, 2001, 285(8): 1059–1070.
- [11] Argoff CE. A focused review on the use of botulinum toxins for neuropathic pain. *The Clinical Journal of Pain*, 2002, 18(Supplement): S177–S181.

- [12] Jabbari B, Maher N, Difazio MP. Botulinum toxin A improved burning pain and allodynia in two patients with spinal cord pathology. *Pain Medicine*, 2003, 4(2): 206–210.
- [13] Cartee TV, Monheit GD. An overview of botulinum toxins: past, present, and future. *Clinics in Plastic Surgery*, 2011, 38(3): 409–426, vi.
- [14] Eleopra R, Tugnoli V, Rossetto O, De Grandis D, Montecucco C. Different time courses of recovery after poisoning with botulinum neurotoxin serotypes A and E in humans. *Neuroscience Letters*, 1998, 256(3): 135–138.
- [15] Shoemaker CB, Oyler GA. Persistence of Botulinum Neurotoxin Inactivation of Nerve Function. *Botulinum Neurotoxins*, 2013, 364: 179–196. DOI: 10.1007/978-3-642-33570-9_9.
- [16] Sloop RR, Cole BA, Escutin RO. Human response to botulinum toxin injection: type B compared with type A. *Neurology*, 1997, 49(1): 189–194.
- [17] Eleopra R, Tugnoli V, Rossetto O, Montecucco C, De Grandis D. Botulinum neurotoxin serotype C: a novel effective botulinum toxin therapy in human. *Neuroscience Letters*, 1997, 224(2): 91–94.
- [18] Brashear A, Lew MF, Dykstra DD, Comella CL, Factor SA, Rodnitzky RL, Trosch R, Singer C, Brin MF, Murray JJ, Wallace JD, Willmer-Hulme A, Koller M. Safety and efficacy of NeuroBloc (botulinum toxin type B) in type A-responsive cervical dystonia. *Neurology*, 1999, 53(7): 1439–1446.
- [19] O’Sullivan GA, Mohammed N, Foran PG, Lawrence GW, Dolly JO. Rescue of exocytosis in botulinum toxin A-poisoned chromaffin cells by expression of cleavage-resistant SNAP-25: IDENTIFICATION OF THE MINIMAL ESSENTIAL C-TERMINAL RESIDUES. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(52): 36897–36904.
- [20] Kuo CL, Oyler GA, Shoemaker CB. Accelerated neuronal cell recovery from Botulinum neurotoxin intoxication by targeted ubiquitination. *PLoS ONE*, 2011, 6(5): e20352.
- [21] Garland M, Babin BM, Miyashita SI, Loscher S, Shen Y, Dong M, Bogoyo M. Covalent modifiers of botulinum neurotoxin counteract toxin persistence. *ACS Chemical Biology*, 2019, 14(1): 76–87.
- [22] Tsai YC, Maditz R, Kuo CL, Fishman PS, Shoemaker CB, Oyler GA, Weissman AM. Targeting botulinum neurotoxin persistence by the ubiquitin-proteasome system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(38): 16554–16559.
- [23] Li B, Cardinale SC, Butler MM, Pai R, Nuss JE, Peet NP, Bavari S, Bowlin TL. Time-dependent botulinum neurotoxin serotype A metalloprotease inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2011, 19(24): 7338–7348.
- [24] Tsai YC, Kotiya A, Kiris E, Yang M, Bavari S, Tessarollo L, Oyler GA, Weissman AM. Deubiquitinating enzyme VCIP135 dictates the duration of botulinum neurotoxin type A intoxication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(26): E5158–E5166.
- [25] Keller JE. Recovery from botulinum neurotoxin poisoning *in vivo*. *Neuroscience*, 2006, 139(2): 629–637.
- [26] Guerreiro MR, Freitas DF, Alves PM, Coroadinha AS. Detection and quantification of label-free infectious adenovirus using a switch-on cell-based fluorescent biosensor. *ACS Sensors*, 2019, 4(6): 1654–1661.
- [27] Kvakova M, Stroffekova K, Stofilova J, Girman V, Bomba A, Antalík M. Toxicological evaluation of fluorescent 11-mercaptopundecanoic gold nanoclusters as promising label-free bioimaging probes in different cancer cell lines. *Toxicology in vitro*, 2021, 73: 105140.
- [28] Wang GY, Fu LB, Walker A, Chen XF, Lovejoy DB, Hao MC, Lee A, Chung R, Rizo H, Irvine M, Zheng M, Liu XH, Lu YQ, Shi BY. Label-free fluorescent poly(amidoamine) dendrimer for traceable and controlled drug delivery. *Biomacromolecules*, 2019, 20(5): 2148–2158.
- [29] Atchudan R, Edison TNJI, Aseer KR, Perumal S, Karthik N, Lee YR. Highly fluorescent nitrogen-doped carbon dots derived from *Phyllanthus acidus* utilized as a fluorescent probe for label-free selective detection of Fe³⁺ ions, live cell imaging and fluorescent ink. *Biosensors and Bioelectronics*, 2018, 99: 303–311.
- [30] Wang ZZ, Liu XX, Li Q, Qiu S, Wang XP, Byambasuren K, Liu ZG, Dang LP, Shu QY. *In vitro* evaluation of a fluorescent microemulsion as an oral delivery carrier and its potential application in tracking bioactive compounds label-free. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(33): 8996–9003.
- [31] Syzdykova LR, Binke S, Keyer VV, Shevtsov AB, Zaripov MM, Zhylybayev AA, Ramanculov EM, Shustov AV. Fluorescent tagging the NS₁ protein in yellow fever virus: Replication-capable viruses which produce the secretory GFP-NS₁ fusion protein. *Virus Research*, 2021, 294: 198291.

- [32] Cui D, Huo SS, Wang X, Zheng ZQ, Zhang YH, Zhang JL, Zhong F. Establishment of canine macrophages stably expressing GFP-tagged canine LC3 protein for effectively detecting autophagy. *Molecular and Cellular Probes*, 2020, 49: 101493.
- [33] Shahabipour F, Oskuee RK, Shokrgozar MA, Naderi-Meshkin H, Goshayeshi L, Bonakdar S. CRISPR/Cas9 mediated GFP-human dentin matrix protein 1 (DMP1) promoter knock-in at the ROSA26 locus in mesenchymal stem cell for monitoring osteoblast differentiation. *The Journal of Gene Medicine*, 2020, 22(12): e3288.
- [34] Tome Y, Kiyuna T, Uehara F, Bouvet M, Tsuchiya H, Kanaya F, Hoffman RM. Imaging the interaction of αv integrin-GFP in osteosarcoma cells with RFP-expressing host stromal cells and tumor-scaffold collagen in the primary and metastatic tumor microenvironment. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2019, 120(1): 283–289.
- [35] Keller JE, Neale EA, Oyler G, Adler M. Persistence of botulinum neurotoxin action in cultured spinal cord cells. *FEBS Letters*, 1999, 456(1): 137–142.
- [36] Wang JF, Zurawski TH, Meng JH, Lawrence G, Olango WM, Finn DP, Wheeler L, Dolly JO. A dileucine in the protease of botulinum toxin A underlies its long-lived neuroparalysis: transfer of longevity to a novel potential therapeutic. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(8): 6375–6385.

Establishment of an intracellular persistence model of botulinum toxin type A light chain

Jie Gao, Jianxin Wang, Nan Nan, Saisai Gong, Tao Li, Hui Wang*

State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100071, China

Abstract: [Objective] An intracellular persistence model of light chain of botulinum toxin type A was established to simulate long-term poisoning caused by botulinum toxin type A. [Methods] The recombinant plasmid pCDNA3.1-ALC-GFP was designed and constructed, the plasmid was extracted for PCR verification, and transfected into Nureo-2a cells for expression. Western Blot and cell immunofluorescence analysis were used to verify the expression of ALC-GFP and its long-term persistence in cells. An intracellular persistence model of light chain of botulinum toxin type A was established, and the model was used for the screening of anti-botulinum toxin drugs. [Results] The recombinant plasmid pCDNA3.1-ALC-GFP was successfully constructed and transfected into Nureo-2a cells, which verified the long-term persistence of ALC-GFP in cells. The intracellular persistence model of light chain of botulinum toxin type A was successfully established, and the potential anti-botulinum drug CB3 of botulinum toxin type A was screened by this model. [Conclusions] The intracellular persistence model of light chain of botulinum toxin type A was successfully established and applied to the screening of CS1, CE2 and CB3 drugs, which laid a foundation for the study of detoxification of botulinum toxin A long-term poisoning.

Keywords: Botulinum toxin type A, light chain, Nureo-2a cell, persistence, drug screening

(本文责编: 李磊)

*Corresponding author. Tel: +86-10-66948532; E-mail: geno0109@vip.sina.com

Received: 24 January 2021; Revised: 30 March 2021; Published online: 30 March 2021