

银环蛇心脏毒素类似物 cDNA 的克隆

汪芳¹, 王义权^{1,2}, 童宗中¹

(1. 南京师范大学生命科学学院遗传资源研究所, 南京 210097; 2. 厦门大学生命科学学院, 厦门 361005)

摘要: 采用 SMART 技术和 RT-PCR 方法, 从同一个银环蛇毒腺中克隆到了 5 种尚未报道过的心脏毒素类似物全长 cDNA 序列 (MNCTLI-a、MNCTLI-b、MNCTLI-c、MNCTLI-d 和 MNCTL2)。5 种序列中, MNCTLI-b、MNCTLI-c、MNCTLI-d 和 MNCTL2 的长度均为 505 bp, 包括 5' 非翻译区 32 bp, 3' 非翻译区 212 bp 和其余 261 bp 组成的一个完整开放阅读框; MNCTLI-a 由于 3' 非翻译区 24 bp 的缺失, 全长 cDNA 仅为 481 bp。所得序列编码区部分与已报道的银环蛇心脏毒素类似物 (cardiotoxin-like protein) 编码区 cDNA 序列的同源性达 95.8% 以上。我们克隆到的序列编码 85 个氨基酸组成的心脏毒素类似物前体, 包括 20 个氨基酸的信号肽和 65 个氨基酸的成熟肽, 与已知的心脏毒素类似物氨基酸组成有很高的同源性。运用 Antheport V4.5 软件分析, 发现编码的蛋白质与眼镜蛇毒中心心脏毒素有相似的结构和性质, 推测它们可能有类似心脏毒素的功能。本研究首次报道了从同一个体的银环蛇毒腺中克隆到多个心脏毒素类似物全长 cDNA 序列, 提示银环蛇心脏毒素类似物基因在该种蛇基因组中有多个拷贝, 并在毒腺细胞中同时转录。

关键词: 心脏毒素类似物; 银环蛇; 全长 cDNA

中图分类号: Q75

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2003)06-0672-05

Cloning and Characterization of cDNAs of Cardiotoxin-like Protein in *Bungarus multicinctus* Venom Gland

WANG Fang¹, WANG Yi-Quan^{1,2}, TONG Zong-Zhong¹

(1. Institute of Genetic Resources, College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China;

2. School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The venom of elapid snakes contains a number of small proteins that display a broad spectrum of pharmacological activities. In study on the neurotoxin from the venom gland of *Bungarus multicinctus*, five cDNA sequences (MNCTLI-a, MNCTLI-b, MNCTLI-c, MNCTLI-d and MNCTL2) encoding two novel proteins were obtained from the total RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction. Among them, four sequences (MNCTLI-b, MNCTLI-c, MNCTLI-d and MNCTL2) are at the length of 505 bp, composing of a 32 bp 5'-untranslational region, a 212 bp 3'-untranslational region, and a 261 bp open reading frame which encodes a 20 amino acids of signal peptide and a 65 amino acids of mature peptide. But the sequence of MNCTLI-a has only 481 bp because of a 24 bp deletion in 3'-untranslational region. Comparison between cDNA sequences obtained here and that of cardiotoxin-like protein reported by Chang previously shows a homological value above 95.8%. Computer simulation based on deduced amino acid sequences reveals that both proteins encoded by these cDNAs and cardiotoxin-like protein share similar molecular characters, suggesting their functional similarity. This result implies that multicopy genes existing in the genome of *Bungarus multicinctus* encode cardiotoxin-like proteins.

收稿日期: 2002-10-21; 修回日期: 2003-05-08

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 39870913)、教育部骨干教师资助计划项目 (GG-180-21002403-1740)、教育部留学回国人员启动基金和江苏省“333 工程”人才培养基金资助

作者简介: 汪芳 (1978-) 女 (汉), 上海人, 硕士研究生, 专业: 动物学分子生物学

通讯作者: 王义权 (1957-), 男 (汉), 教授, 博士生导师, 专业: 动物分子遗传学, Tel: 0592-2184427, E-mail: wangyiquan@jlonline.com

Key words: cardiotoxin-like protein; *Bungarus multicinctus*; full-length cDNA

银环蛇毒的主要成分是神经毒素,其中 α -银环蛇毒素是银环蛇毒中的一种长链神经毒素,与乙酰胆碱竞争性结合突触后膜运动终板上的乙酰胆碱受体,阻断神经-肌肉间的冲动传导,使骨骼肌,尤其是呼吸肌麻痹,造成呼吸运动停止而死亡^[1];另一类与 α -银环蛇毒素同属于三指型蛋白家族的毒素——心脏毒素,主要存在于眼镜蛇毒中。心脏毒素没有特异性的作用靶点,生物学效应广泛,不同细胞对心脏毒素作用反应不同^[2~6],但心脏毒素与 α -银环蛇毒素的空间结构十分相似,Jeyaseelan 等^[7]认为, α -银环蛇毒素和心脏毒素可能来源于某个共同的祖先型基因,经过基因加倍(duplication),然后在进化过程中出现分化,分别形成 α -银环蛇毒素和心脏毒素基因。一些具特殊二硫键结构的长链神经毒素广泛存在于眼镜蛇毒中^[8~10]。然而,迄今关于银环蛇毒中发现心脏毒素类似物的报道却不多^[11,12]。我们在对编码 α -银环蛇毒素的 cDNA 序列研究过程中,克隆到几种新的心脏毒素类似物 cDNA,首次报道了从一个银环蛇毒腺中克隆到了两种以上心脏毒素类似物的全长 cDNA 序列,与 Chang 等报道的心脏毒素类似物 cDNA 序列相近^[11],对所得序列编码蛋白质性质的计算机模拟分析表明,蛋白质结构与眼镜蛇毒中的心脏毒素相似,可能具有类似心脏毒素的功能。

1 材料和方法

1.1 材料

银环蛇(*Bungarus multicinctus*)购自南京惠民桥农贸市场,排毒诱导毒腺 mRNA 表达,3 天后用利刀迅速切下蛇头,置液氮中保存备用。总 RNA 提取用的 RNAGents® Total RNA Isolation System 试剂盒和质粒提取试剂盒购自 Promega 公司,构建 cDNA 文库的 SMART™ cDNA Library Construction 试剂盒购自 Clontech 公司。反转录酶 SuperScript™ II Rnase H⁻ Reverse Transcriptase 购自 Life Technologies 公司,焦碳酸二乙脂(DEPC)购自生工公司(Amresco 分装)。PCR 产物纯化和胶纯化试剂盒购自上海华舜生物工程公司,pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司。

1.2 毒腺 RNA 抽提和反转录合成 cDNA

总 RNA 的抽提方法按照试剂盒手册进行,甲醛变性凝胶电泳检测 RNA。反转录过程采用

SMART 技术合成第一链 cDNA;LD-PCR(long distance polymerase chain reaction)合成第二链 cDNA,琼脂糖胶电泳检测 PCR 产物。

1.3 心脏毒素类似物 cDNA 的克隆

1.3.1 3' RACE

3' RACE 的下游引物 CDS3 是参照 SMART 试剂盒中所用接头 CDS III/3' PCR 引物合成;根据神经毒素信号肽保守序列设计 3' RACE 的上游基因特异性引物 CTXS,序列为:5' -AAGAT-GAAA ACTCTGCTGCTGAC-3'。以稀释的双链 cDNA 为模板进行 PCR 扩增:95℃ 先预变性 4min;按以下循环参数进行 30 个循环:95℃ 变性 30s,62℃ 退火 30s,72℃ 延伸 40s;最后 72℃ 保温 20min。PCR 产物琼脂糖凝胶电泳后,将 500 bp 大小的片段切下纯化,装入 T 载体,经克隆测序。

1.3.2 5' RACE

参照 SMART 试剂盒中所用接头 SMART III Oligonucleotide 合成 5' RACE 的上游引物 5' PCR;根据本研究中测得的 3' RACE 序列设计 5' RACE 的下游基因特异性引物 NTL3,序列如下:5' -GCGCTCGAATTGTCTCTTGTGC-3'。以稀释的双链 cDNA 为模板,扩增条件除退火温度改为 56℃ 外,其余同 3' RACE。PCR 产物电泳后,将约 300 bp 的 DNA 片段纯化后直接测序。寡核苷酸引物均由上海生工公司合成,测序采用 ABI PRISM® Big-Dye™ 测序试剂盒,310 遗传分析仪测序。

1.4 数据分析

DNA 序列用 Blastn 程序在 GenBank 中搜寻同源的碱基序列;经 ClustalX 1.8 和 Mega2.1 对搜索到的同源序列进行核苷酸比对;用 Antheport V4.5 蛋白分析软件从所得 DNA 序列推导其编码的氨基酸序列,并进行结构和性质分析。

2 结果与讨论

2.1 银环蛇心脏毒素类似物 cDNA 序列及分析

根据 SMART 技术原理,用该试剂盒得到的双链 cDNA 均为全长 cDNA^[13,14]。琼脂糖胶电泳检测,双链 cDNA 为 500 bp 以上的拖尾(图 1-A)。3' RACE 产物(图 1-B)经克隆测序,分别获得编码心脏毒素类似物的 403 bp 和 379 bp cDNA 序列。比

对后从所测的 8 个克隆中,共得到 5 种 3' RACE 序列 3' MNCTL1-a (1 个)、3' MNCTL1-b (2 个), 3' MNCTL1-c (1 个), 3' MNCTL1-d (3 个) 和 3' MNCTL2 (1)。经 BLAST 分析,这些序列编码区与 Chang 等^[11]报道的心脏毒素类似物 (cardiotoxin-like protein, CLP) 同源性达 95.8% 以上。

5' RACE 扩增得到约 300 bp 的扩增片段 (图 1-C), 由于编码引导肽部分的 DNA 序列在三指型蛋白家族的蛇毒素中高度保守^[15], 故 5' RACE 的 PCR 产物纯化后直接测序, 获得 267 bp cDNA 序列。5' 和 3' RACE 序列拼接后得到编码心脏毒素类似物 505 bp 的 cDNA 序列 4 种 (MNCTL1-b, MNCTL1-c, MNCTL1-d 和 MNCTL2), 序列包括 5' 非翻译区有 32 bp, 完整的编码区 261 bp, 3' 非翻译区 212 bp。MNCTL1-a 与前 4 个序列比较 3' 非翻译区部分缺失了 24 bp, 仅有 481 bp (图 2); MNCTL1-b, MNCTL1-c, MNCTL1-d 和 MNCTL2 在 484 bp 处, MNCTL1-a 在 460 bp 处有一个加 poly A 的信号 AATAAA, 序列的 3' 端为 poly A, 表明我们克隆的这 5 种序列为全长 cDNA。这是首次对从一个银环蛇毒腺中克隆到的多个心脏毒素类似物基因全长 cDNA 序列的报道。所测得的序列已送入 GenBank, 序列登录号为: AF459447~AF459451。

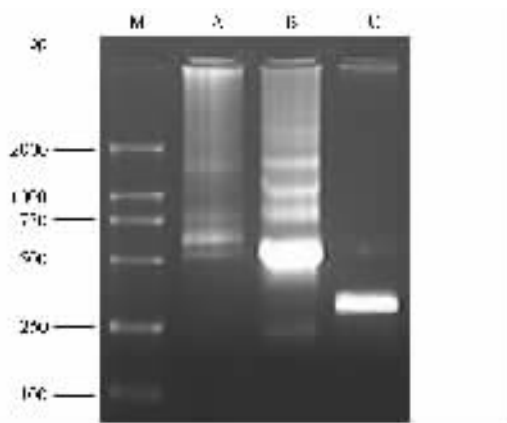


图 1 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

M: DL2000 分子量标记; A: LD-PCR 合成的双链 cDNA;
B: 3' RACE, C: 5' RACE。

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis
of amplified products

M: DL2000 marker; A: dscDNA amplified by LD-PCR;
B: 3' RACE, C: 5' RACE.

报道的 CLP 比对^[11], 发现除 156 位, 179 位, 206 位, 207 位碱基的突变造成了编码蛋白氨基酸的差异外, 编码成熟肽的核苷酸序列还存在一些同义突变 (图 2)。

虽然 3' RACE 产物的序列差异, 有可能是反转录过程中的转录差错造成, 但以同一反转录产物为模板, 5' RACE 的产物却未出现多态现象, 因此, 这里出现的序列差异不会是人为假象造成, 而是基因组转录产物中确实存在的。从图 2 中可见, 得到的几种银环蛇心脏毒素类似物 cDNA 的 5' 端非翻译区和信号肽部分序列高度保守, 但编码成熟肽的核苷酸序列和 3' 端非翻译区序列呈现多态性, 提示银环蛇心脏毒素类似物基因在其基因组中可能有多个拷贝, 这种多拷贝基因编码的产物间功能上有何差异? 在动物进化和与适应方面有何意义? 有待进一步研究。

此外, 本研究得到的蛇毒心脏毒素类似物与神经毒素、心脏毒素的比对结果还表明, 编码信号肽部分的碱基序列保守性极高 (图 2), 可能与这些蛇毒蛋白在毒腺中有共同的转运和分泌途径有关。不同的蛇毒基因可能源自共同的祖先型基因, 经过加倍, 形成多拷贝基因, 在随后的生物进化过程中, 起生物学活性作用的成熟肽部分, 适应不同的栖息环境和捕捉不同的食物, 逐渐分化形成功能各异的毒素, 导致不同种类蛇, 甚至不同地域同种蛇的不同个体间, 蛇毒成分的差异^[16]; 而各种蛇毒成分的信号肽, 由于具有相同的功能, 则保持了较高的同源性。

2.2 银环蛇心脏毒素类似物的氨基酸序列分析

心脏毒素类似物基因编码 85 个氨基酸组成的多肽, 其中信号肽部分 20 个氨基酸, 成熟肽部分 65 个氨基酸。5 种 cDNA 序列中 MNCTL1-a, MNCTL1-b, MNCTL1-c, MNCTL1-d 编码心脏毒素类似物蛋白质 MNCTL1; MNCTL2 则编码另一种心脏毒素类似物 MNCTL2, 与 Chang 等^[11]报道的蛋白质序列 (CLP) 的同源性分别达到 95.3% 和 96.6%。3 种心脏毒素类似物氨基酸比对结果显示, 第 41 位氨基酸有 2 种, 分别为缬氨酸 (V) 和甲硫氨酸 (M), 均为非极性氨基酸; MNCTL1、MNCTL2 中第 49 位非极性氨基酸色氨酸 (W) 替换了 CLP 中带正电的极性氨基酸精氨酸 (R); 第 57 位同样为非极性氨基酸的异亮氨酸 (I) 替代甲硫氨酸 (M); 第 58 位则由带负电荷的谷氨酸 (E) 取代了不带电荷的谷氨酰胺 (Q) (图 3)。

将克隆到的心脏毒素类似物 cDNA 序列与已

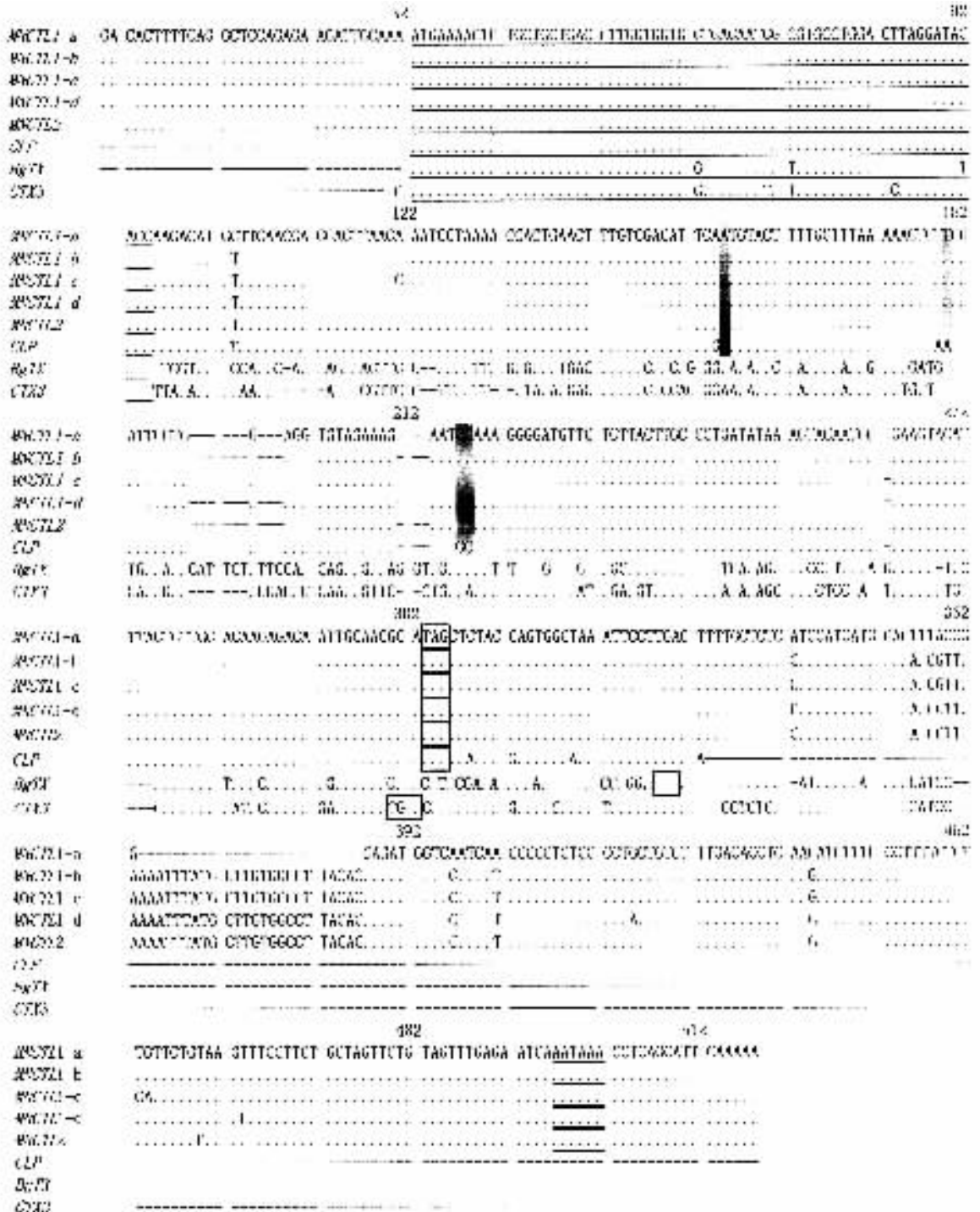


图 2 心脏毒素类似物 cDNA 序列

下划线部分为信号肽,双下划线部分为加尾信号,点表示相同碱基,短横表示缺失,方框表示终止密码子,阴影表示引起氨基酸变异的碱基位点;CLP:心脏毒素类似物(Y10870) BgTX:α-银环蛇毒素(Y17058) CTX3:心脏毒素 3(Z54227)。

Fig. 2 cDNA sequences of cardiotoxin-like protein

Sequence underlined is signal peptide encoding region, and that double-underlined is poly A adding signal.

Identical nucleotides are indicated by dots and deleted nucleotides indicated by dashes. Sequences marked with boxes are stop code, and that marked with shadow denote a mutation introducing change of amino acid.

CLP: Cardiotoxin-like Protein (Y10870) BgTX: α-Bungarotoxin (Y17058) CTX3: Cardiotoxin 3 (Z54227).

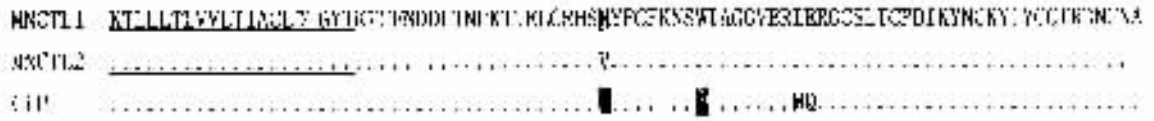


图3 由cDNA序列推导的氨基酸序列

下划线标出的为信号肽部分,点表示相同的氨基酸。CLP:心脏毒素类似物蛋白质氨基酸序列(Y10870)。

Fig. 3 Deduce amino acid sequence of cardiotoxin-like protein from cDNA sequences

The underline indicates signal peptide and the dot is instead of identical amino acid to the first line. CLP: cardiotoxin-like protein (Y10870).

用蛋白质分析软件对编码蛋白质的性质进行了模拟分析。MNCTL1、MNCTL2 大小约为 9.66 kDa 和 9.63 kDa,等电点均为 7.775,CLP 等电点 8.205 低,可能与 57 位谷氨酸所带的负电荷有关,但与大多数蛇毒蛋白质一样,仍为碱性多肽。用 Garnier 法对蛋白质的二级结构预测,MNCTL1 的二级结构中,螺旋结构(helix)11%,折叠结构(sheet)22%,转角结构(turn)51%,无规则卷曲(coil)16%;MNCTL2 中,螺旋结构(helix)8%,折叠结构(sheet)26%,转角结构(turn)51%,无规则卷曲(coil)15%。考虑到蛋白质功能与蛋白质疏水性间的关系,我们对几种蛋白质的疏水性进行比较,克隆到的序列编码的蛋白质与眼镜蛇毒中心心脏毒素蛋白质的疏水性质最接近,提示它们之间某些功能上的相似,从另一个方面说明这 5 种 cDNA 序列编码的蛋白质为新的心脏毒素类似物。

参考文献(References):

[1] Balass M, Katzir E K, Fuches S. The α -bungarotoxin binding site on the nicotinic acetylcholine receptor: Analysis using a phage-epitope library [J]. *Biochemistry*, 1997, 94: 6045~6058.

[2] Hodges S J, Agbaji A S, Harven A Y, Hider R C. Cobra cardiotoxins-purification, effect on skeletal muscle and structure activity relationships [J]. *Eur J Biochem*, 1987, 165: 373~383.

[3] Fletcher J E, Jiang M S. Review article possible mechanism of action of cobra snake venom cardiotoxin and bee venom melittin [J]. *Toxicon*, 1993, 31: 669~695.

[4] Liou R F, Chang W C, Chu S T, Chen Y H. Snake venom cardiotoxin can rapidly induce actin polymerization on intact platelets [J]. *J Biochem*, 1993, 290: 591~594.

[5] Chiou S H, Raynor R L, Zheng B, Chambers T C, Kuo J F. Cobra snake venom (cytotoxin) isoform and neurotoxin: Comparative potency of protein kinase C inhibition and cancer cell cytotoxicity and modes of enzyme inhibition [J]. *Biochemistry*, 1993, 32: 2062~2067.

[6] Ownby C L, Fletcher J E, Colberg T R. Cardiotoxin 1 from co-

bra (*Naja naja atra*) venom cause necrosis of skeletal muscle *in vivo* [J]. *Toxicon*, 1993, 31: 697~709.

[7] Jeyaseelan K, Armugam A, Lachumanan R, Tan C H, Tan N H. Six isoforms of cardiotoxin in Malayan spitting cobra (*Naja naja sputatrix*) venom: cloning and characterization of cDNAs [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1380: 209~222.

[8] Qian Y C, Fan C Y, Gong Y, Yang S L. cDNA sequence analysis and expression of four long neurotoxin homologues from *Naja naja atra* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1443: 233~238.

[9] Zhong Xiao-yan, Pan Hua, Wu Jun, Yang Guang-Zheng, Wu Xiang-Fu, Zhou Yuan-Cong. Cloning and functional Expression of Neurotoxin cDNA from *Naja naja atra* [J]. *Prog Biochem Biophys*, 2000, 32(1): 90~95.

[10] CAI Qin, HE Zhi-Yong, GONG Yi, YANG Sheng-Li. Cloning and expression of short-chain neurotoxin from Chinese Cobra in *Escherichia coli* [J]. *Hereditas (Beijing)*, 1999, 21(5): 1~4. 蔡勤,何志勇,龚毅,杨胜利. 中华眼镜蛇神经毒素 cDNA 的克隆及在大肠杆菌中的表达 [J]. *遗传*, 1999, 21(5): 1~4.

[11] Chang L S, Lin J. cDNA sequence analysis of a novel cardiotoxin-like protein from Taiwan banded krait [J]. *Biochem Mol Biol Int*, 1996, 40(6): 1271~1276.

[12] Wu S H, Wang K T, Ho C L. Purification and pharmacological characterization of a cardiotoxin-like protein from Formosan banded krait (*Bungarus multicinctus*) venom [J]. *Toxicon*, 1982, 20(4): 753~764.

[13] Endege W O, Steinmann K E, Boardman L A, Thibodeau S N, Schlegel R. Representative cDNA libraries and their utility in gene expression profiling [J]. *BioTechniques*, 1999, 26(3): 542~550.

[14] TONG Zong-Zhong, WANG Yi-Quan, ZHOU Kai-Ya, WU Xi-ao-Bing. Full-length cDNA library construction of the venom gland from *Naja naja* [J]. *Journal of Nanjing Normal University (Nature Science)*, 2000, 23(3): 268~272. 童宗中,王义权,周开亚,吴孝兵. 眼镜蛇毒腺全长 cDNA 文库的构建 [J]. *南京师大学报(自然科学版)*, 2000, 23(3): 268~272.

[15] Chang L S, Lin J, Chou Y C, Hong E. Genome structure of cardiotoxin 4 and cobrotoxin from *Naja naja atra* (Taiwan Cobra) [J]. *Biochim Biophys Res Commun*, 1997, 239: 756~762.

[16] Dalry J C, Wuster W, Thorpe R S. Diet and snake venom evolution [J]. *Nature*, 1996, 379: 537~540.