

一个新的东亚钳蝎毒素(Bm KT₁) 全长 cDNA 的克隆和分析*

曾宪春 李文鑫** 朱智慧 朱顺义 彭方 毛歆

(武汉大学生命科学院生物技术系, 武汉 430072)

摘要 首先构建了东亚钳蝎毒腺组织 cDNA 文库; 根据已知的东亚钳蝎哺乳动物毒素氨基酸序列保守区设计引物, 并用 PCR 从 cDNA 文库中扩增出一个 cDNA 片段作为筛选 cDNA 文库的探针; 从 cDNA 文库中筛选到二个编码同一个新的蝎毒素多肽的 cDNA, 它们除 3'-UTR 外, 其余序列完全一致. 它们均含有 255 bp 长的开放阅读框, 编码 85 肽的前体毒素, 包括 19 个氨基酸残基的信号肽, 66 个残基的成熟毒素(命名为 Bm KT₁); Bm KT₁ 氨基酸序列与已知的蝎毒素具有较大的同源性, 与 Bm KM₁, Lqq III, Lqh α II 和 Bm KM₁₀ 的同源性分别为 77%、67%、67% 和 65%. Bm KT₁ 的 C 端不存在末端修饰步骤且具有一个与这些毒素不相同的特征结构, 即在末端延伸了两个氨基酸残基-P-S, 推测 Bm KT₁ 具有新的活性功能特征.

关键词 东亚钳蝎(*Buthus martensii* Karsch), cDNA, 毒素

中图分类号 Q 78

Cloning and Characterization of the Full Length cDNA Sequence of a New Venom Peptide (Bm KT₁) from Chinese Scorpion *Buthus martensii* Karsch*

ZENG Xian-chun, LI Wen-xin**, ZHU Zhi-hui, ZHU Shun-yi, PENG Fang, MAO Xin

(Department of Biotechnology, School of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract A cDNA library was constructed from the venom gland of Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch (BmK). A cDNA probe for screening the cDNA library was obtained by PCR amplification with primers designed and synthesized according to the conserved sequences of BmK mammalian neurotoxins. With the probe, two cDNAs of a scorpion toxin were isolated from the library. Except for their 3'-UTR, other sequences of the two cDNAs were identical. Both the cDNAs displayed an ORF (open reading frame) of 255 bp, which encoded a toxin precursor of 85 residues including a signal peptide of 19 residues and a mature peptide (named Bm KT₁) of 66 residues. The analysis of amino acid sequence similarity indicated that the Bm KT₁ was homologous with some scorpion toxins, showing 77%, 67%, 67%, 65% sequence identity with that of Bm KM₁, Lqq III, Lqh α II, Bm KM₁₀ respectively. The C-terminus of Bm KT₁ has no modification and has a peculiar end-structure compared with other toxins, showing two extended residues -P-S. The difference in 3'-UTR between the two cDNAs suggested that they were evolved from a common ancestor gene and an interesting evolution mechanism was underwent by the scorpion for adjusting to various environment.

Key words *Buthus martensii* Karsch, cDNA, Toxin

* 国家医药技术创新博士基金(96-901-16-033)、武汉市青年科技晨光计划(965001037-24)和国家自然科学基金(39970897)资助课题
该 cDNA 序列已被 GenBank 数据库接收, 接受号为 AF150011

** 联系人 Tel: (027) 87682831, Fax: (027) 87882661, E-mail: liwxlab@whu.edu.cn

曾宪春, 男, 1966年7月生, 博士, 副教授

收稿日期: 1999-11-12, 修回日期: 2000-02-03

蝎毒素主要是一类由28~70个氨基酸残基组成的小分子多肽。它们可选择性地作用于细胞膜上钠、钾、钙和氯离子通道,改变离子的通透能力^[1~3]。作用于Na⁺通道的蝎毒素由60~70个氨基酸残基组成,含4对二硫键^[3];作用于K⁺通道的蝎毒素多数由28~38个氨基酸残基组成,含3~4对二硫键;少数K⁺毒素含61~65个氨基酸残基及3对二硫键;而作用于Cl⁻通道的蝎毒素一般由35~38个氨基酸残基组成,含4对二硫键;作用于Ca²⁺通道的蝎毒素目前发现的至少有两个:一个由33个氨基酸组成;另一个是两个多肽(分别含104和27个氨基酸)组成的二聚体。由于蝎毒素与细胞离子通道的结合具有较高的选择性与专一性,目前它已成为分子生物学、神经生物学、分子免疫学、生理学和药理学等研究领域的重要材料。在药物开发方面,有些蝎毒素具有抗癫痫、镇痛和抗肿瘤等药理活性,这些毒素正日益成为新药的开发源泉或新药设计的分子模板。

东亚钳蝎(*Buthus martensii* Karsch, BmK)为我国产主要蝎种。我国学者对BmK毒素的研究主要集中在毒素组份的分离纯化及其序列和结构的研究^[1],近年来才见有关BmK基因的研究报道^[1,3]。为了寻找新型东亚钳蝎毒素多肽,为有关新药的设计和开发提供线索,我们首次克隆了一个新的Na⁺通道抑制剂全长cDNA,其编码的毒素多肽与其它同类蝎毒素相比,具有一些新的结构特征。

1 材料和方法

1.1 材料

东亚钳蝎采自湖北农村; PolyA Tract mRNA分离试剂盒购自Promega公司; SuperscriptTM Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning试剂盒购自GBCO/BRL; Nucleon QC System购自Amersham; ElectroMax DH10BTM Cells购自GBCO/BRL; 其它生化试剂和酶购自Promega或华美生物工程公司。

1.2 东亚钳蝎毒腺组织cDNA文库的构建

将蝎子电刺激取毒2~3d后,剪取尾节毒腺,液氮碾碎,用改进的异硫氰酸胍一步法^[5]提取毒腺组织总RNA。经PolyA Tract mRNA分离试剂盒分离纯化mRNA。取5 μg mRNA用SuperscriptTM Plasmid System合成双链cDNA,加上接头并用Not I-Sal I切割后,用Nucleon QC System除去残余的接头。内切酶切下的片段及小于70 bp的cDNA,再连接到pSPORT I载体,用电击法转化大

肠杆菌DH10B。从1 μg cDNA可得约 1.8×10^6 个转化克隆子。

1.3 cDNA探针的合成与克隆

根据已知东亚钳蝎哺乳动物毒素多肽两个保守区设计PCR正反向引物,以cDNA文库作模板扩增cDNA片段作为筛选cDNA文库的杂交探针;正向引物为5'-GTTCGGGATGCTTATATTGC-3',对应于BmKM₁的1~7位氨基酸序列,反向引物为3'-TCAACCGATAACGGTTACC-5',对应于BmKM₁的33~38位氨基酸序列;扩增出的cDNA片段克隆至pGEM-T载体(Promega),并测序。

1.4 cDNA文库的筛选

用[α-³²P]dCTP标记cDNA探针(随机引物合成法),用菌落原位杂交筛选cDNA文库^[1],经高密度和低密度两轮筛选,确定杂交信号适中的为阳性克隆。

1.5 DNA序列分析

用大量碱法提取质粒DNA,以通用的T7启动子引物为测序引物,用A13IPRISMTM377 DNA sequencer进行自动测序,测序工作由TaKaRa Biotechnology(Dalian) Co., Ltd完成。

2 结果与讨论

2.1 东亚钳蝎毒腺组织cDNA文库的构建

从60只蝎子得到1g毒腺组织,分离纯化出10 μg Poly(A)⁺mRNA。将[α-³²P]dCTP标记的双链cDNA在2.0%的碱性琼脂糖凝胶上电泳,并经放射性自显影。结果显示cDNA大小主要分布在300~550 bp之间,这与蝎毒素多肽大小的分布区间相符。为避免有用cDNA的丢失,我们采用Nucleon QC系统除去双链中70 bp以下的片段,而不用SuperscriptTM试剂盒提供的cDNA分级分离柱。

2.2 cDNA探针序列

根据已知毒素两个保守区设计PCR引物,以cDNA文库为模板扩增出的cDNA探针序列为:

5'-GTTCGGGATGCTTATATTGCCAAGCCCGA
AAACTGTGTATACGAATGTGGTATAACTCA
AGTTTGCACAATAATGTAAGTAAATGG
TGCTGAGAGTGGCTATTGCCAATGG-3'。对GenBank数据库进行同源性搜寻表明,它为BmKM₁₀cDNA序列的一部分。

2.3 目的基因的筛选和测序

经初筛和复筛,从5000个cDNA文库克隆子中共得到40个杂交信号适中的阳性克隆,经酶切分析,

其插入片段大小在300 bp 与450 bp 之间. 选取较长的5个插入片段进行序列分析, 得到二个编码同一蝎毒素的全长 cDNA, 它们除3'-UTR 外, 其余序列完

全一致. 它们编码85肽的前体毒素蛋白 (Fig. 1), 我们将其代表的成熟毒素多肽命名为 BmKT₁.

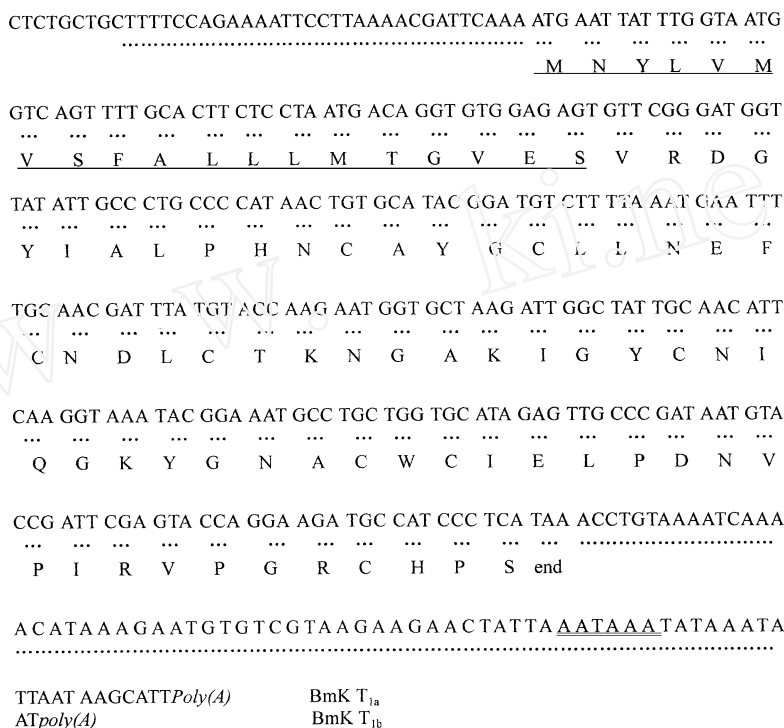


Fig 1 cDNA sequence of the precursor of BmKT₁ and the corresponding amino acid sequence from scorpion *Buthus m artensii* Karsch

The signal peptide is underlined; the polyadenylation signal AAATAAA is underlined twice; the identical nucleotide sequences are indicated by points

如 Fig. 1所示, BmKT₁前体由N端19个氨基酸残基的信号肽和66个残基的成熟毒素组成, 其信号肽的切割位点位于中性小分子残基 Ser 右侧, 酶切位点前第3位为 Val, 这与多数蝎毒素信号肽特点相似. BmKT₁成熟毒素与一些已知的蝎毒素具有较大同源性 (Fig. 2), 与 BmKM₁^[4]同源性最大, 为77%; 与 LqqIII^[7], Lqh α II^[8]和 BmKM₁₀ (引自 GenBank 数据库) 的同源性分别为67%, 67% 和65%. 显然, BmKT₁与 BmKM₁, LqqIII, Lqh α II 和 BmKM₁₀ 属同一毒素家族. 与该家族的其它毒素相比, BmKT₁在许多氨基酸序列的保守部位发生了变异, 如 A₄ G₄, K₈ L₈, V₁₃ A₁₃, E₁₅ G₁₅, S₃₃ I₃₃, Q₃₇ N₃₇, W₃₈ I₃₈, K₆₂ R₆₂等. 尤其值得注意的是, BmKT₁毒素前体的成熟过程并不象其它的蝎毒素须进行C端修饰, 即切除1~3个额外的碱性氨基酸 (R, K)^[2], 而是多了两个不须切除的小分子氨基酸 (PS). 推测 BmKT₁具有某些新的活性特点. 这是因为蝎毒素末端的氨基酸结构对其活性和功能的影响往往是较大

的. 如 Aah II 与 Lqh II 相比, 仅由于C端一个氨基酸的差异, 就使 Lqh II 获得了比 Aah II 强得多的抗昆虫活性^[9]. 对 BmKT₁活性特点的研究, 将对天然蝎毒素多肽一级结构的遗传学修饰提供线索. BmKT₁前体信号肽序列与 BmKM₁前体信号肽仅有两个氨基酸差异.

BmKT₁ mRNA 的5'UTR 序列与已报道的东亚钳蝎毒素 BmKM₁基本一致^[4], 表明它们可能具有相似的翻译起始调控机制. AUG 的旁侧序列为 TCAAA, 这也是许多东亚钳蝎长链毒素 cDNA 的共有序列 (曾宪春, 私人通讯), 它对毒素多肽翻译起始调控的意义有待进一步研究. 编码 BmKT₁ 的两个 cDNA 序列仅在3'-UTR 腺苷化信号后的序列存在差异, 且前者比后者长10个碱基 (Fig. 1). 目前的研究表明, 真核 mRNA 3'-UTR 在基因表达调控中发挥着重要作用. 3'-UTR 可控制 mRNA 的降解速率^[10], 还参与了 mRNA 的翻译调控, 并可控制其翻译的时间、地点^[11]. 因此, 这两 cDNA 序列在3-

UTR 的变异对蝎子适应内外环境的不同变化可能 具有重要意义 .

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
BmKT ₁	V	R	D	G	Y	I	A	L	P	H	N	C	A	Y	G	C	L	L	N	E	F	C	N	D	L	C	T
BmKM ₁	.	.	.	A	.	.	.	K	V	.	E	.	A	R	.	Y
LqqIII	.	.	.	A	.	.	.	K	N	Y	.	.	V	.	E	.	F	R	D	S	Y	.	.	E	.	.	.
Lqh α IT	.	.	.	A	.	.	.	K	N	Y	.	.	V	.	E	.	F	R	D	A	Y	.	.	E	.	.	.
BmKM ₁₀	.	.	.	A	.	.	.	K	.	E	.	.	V	.	E	.	G	I	T	Q	D	.	.	K	.	.	.
	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
BmKT ₁	K	N	G	A	K	I	G	Y	C	N	I	Q	G	K	Y	G	N	A	C	W	C	I	E	L	P	D	N
BmKM ₁	S	.	.	.	Q	W	V	G
LqqIII	S	S	.	.	.	Q	W	A	Y	A	.	.	.
Lqh α IT	S	S	.	.	.	Q	W	A	Y	A
BmKM ₁₀ E	.	.	.	E	S	Q	W	G	K	.	.	S
	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66															
BmKT ₁	V	P	I	R	V	P	G	R	C	H	P	S															
BmKM ₁	K															
LqqIII	K															
Lqh α IT	K															
BmKM ₁₀	K	.	Q	.	.															

Fig 2 Comparison of amino acid sequence of BmKT₁ with that of some other toxins
 Amino acids common to BmKT₁ are indicated by “.”, BmKM₁^[4] and BmKM₁₀ (from GenBank data) were from *Buthus martensii* Karsch; Lqq III was from *Leiurus quinquestratus quinquestratus*^[7]; Lqh α IT was from *Leiurus quinquestratus hebraeus*^[8]

参考文献 (References)

- Ji Y H, Li Y J, Zhang J W, Song B L, Yanaki T, Mochizuki T, Hoshino M, Yanaiharu N Covalent structures of BmKAS and BmKAS-1, two novel bioactive polypeptides purified from Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Toxicon*, 1999, **37**: 519~ 536
- Becerril B, Marangoni S, Possani L D. Toxins and genes isolated from scorpions of the Genus Tityus *Toxicon*, 1997, **35** (6), 821 ~ 835
- Xiong Y M, Ling M H, Lan Z D, Wang D C, Chi C W. The cDNA sequence of an excitatory insect selective neurotoxin from the scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Toxicon*, 1999, **37**: 335~ 341
- Xiong Y M, Ling M H, Lan Z D, Wang D C, Chi C W. The cDNA and genomic DNA sequences of a mammalian neurotoxin from the scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Toxicon*, 1997, **35**: 1025~ 1031
- Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162**: 157~ 165
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989
- Kopeyan C, Mansuelle P, Martin-Eauclaire M F, Rochat H, Miranda F. Characterization of toxin III of the scorpion *Leiurus quinquestratus quinquestratus*: a new type of alpha-toxin highly toxic both to mammals and insects *Natural Toxin*, 1993, **1**: 308~ 312
- Eitan M, Fowler E, Hemann R, Duval A, Pelhate M., Zlotkin E A scorpion venom neurotoxin paralytic to insects that affect sodium current inactivation: purification, primary structure, and mode of action *Biochemistry*, 1990, **29**: 5941~ 5947
- Sautiere P, Cestele S, Kopeyan C, Martinage A, Drobecq H, Dolijansky Y, Gordon D. New toxins acting on sodium channels from the scorpion *Leiurus quinquestratus hebraeus* suggest a clue to mammalian vs insect selectivity *Toxicon*. 1998, **36** (8): 1141 ~ 1154
- Chen C Y A, Shyu A B. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation *TIBS*, 1995, **20** (11): 465~ 470
- Kolmus H, Flohe L, McCarthy J E G. Analysis of eukaryotic mRNA structures directing contranlational incorporation of selenocysteine, *Nucleic Acids Res*, 1996, **24** (7): 1195~ 1201