

# 东亚钳蝎中一个中性哺乳动物神经毒素 全长 cDNA 的克隆和分析

朱智慧,曾宪春,王三霞,李文鑫,朱顺义

(武汉大学生命科学院生物技术系,武汉大学病毒学研究所,武汉 430072)

**摘要:**构建了东亚钳蝎毒腺 cDNA 文库,根据东亚钳蝎中性哺乳动物神经毒素 BmKM4 的氨基酸序列设计并合成引物,用 PCR 方法从文库中筛选到 BmKM4 全长 cDNA 序列。它由 5'UTR、可读框和 3'UTR 组成。与其他东亚钳蝎哺乳动物神经毒素 cDNA 的相应区域相比,BmKM4 cDNA 的 5'UTR 高度保守,而其 3'UTR 则变异较大。AUG 的旁侧序列为 AAAATGAA,与绝大多数蝎毒素基因一致。在 BmKM4 mRNA poly(A) 尾上游 17nt 处,有一典型的腺苷化信号(AATAAA)。可读框编码 84 个氨基酸的毒素前体,包括 N 端 19 个氨基酸残基组成的信号肽,中间 64 个氨基酸残基组成的成熟毒素,以及 C 末端的额外碱性氨基酸 Arg。据一般规律,尾端 Arg 在毒素前体的成熟过程中会被切除。

**关键词:**东亚钳蝎;中性哺乳动物神经毒素;BmKM4;cDNA

中图分类号:Q78

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2001)05-0431-04

## Molecular Cloning and Analysis of the cDNA Sequence Encoding a Neutral Mammalian Neurotoxin from the Chinese Scorpion *Buthus martensii* Karsch

ZHU Zhi-hui, ZENG Xian-chun, WANG San-xia, LI Wen-xin, ZHU Sun-yi

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

**Abstract:** A full-length cDNA sequence encoding the precursor of a neutral mammalian neurotoxin, BmKM4, was first isolated from a cDNA library made from the venom gland of Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch. A BmKM4-specific primer and a primer corresponding to the partial sequence of pSPORT1 vector were used as forward primer and reverse primer, respectively, to screen the cDNA library by PCR reaction. Sequence analysis of positive clones showed that the BmKM4 cDNA is composed of three parts: 5'UTR, open reading frame and 3'UTR. Compared with the corresponding regions of other scorpion mammalian neurotoxin cDNAs, the 5'UTR of BmKM4 cDNA is highly conservative versus highly variable for 3'UTR. The lateral sequence of initiation codon (AUG) is AAAATGAA which is in consistent with that of most scorpion toxin genes. On the 3'-end, a putative polyadenylation signal (AATAAA) was 17nt upstream of Poly (A) tail. The open reading frame encodes a precursor of 84 amino acid residues, including a signal peptide of 19 residues, a mature toxin (BmKM4) of 64 residues, and a basic residue (Arg) tail which would be removed in the processing step.

**Key words:** *Buthus martensii* Karsch; neutral mammalian neurotoxin; BmKM4; cDNA

收稿日期:2000-09-29;修回日期:2001-02-21

基金项目:国家自然科学基金(39970897)、国家医药技术创新博士基金(96-901-11-033)、武汉市青年科技晨光计划(96500137-24)资助项目

作者简介:朱智慧(1974-),男(汉),湖南,硕士生,专业方向:动物毒素基因分子生物学

并列第一作者:曾宪春(1967-),男(汉),湖北,博士,专业方向:动物毒素基因分子生物学

通讯作者:李文鑫(1949-),男(汉),湖北,博士,教授,博导,专业方向:肿瘤分子生物学。

蝎毒素的主要成分是一些由 30~76 个氨基酸组成的多肽,它们绝大多数含 3~4 对二硫键,可选择性地作用于细胞膜上的钠、钾、钙、氯等离子通道,改变细胞膜对离子的通透能力<sup>[1]</sup>。作用于钠离子通道的毒素较长,由 60~76 个氨基酸残基组成,含 4 对二硫键<sup>[1]</sup>;而作用于钾离子通道的毒素则相对较短,一般只有 31~39 个氨基酸,含 3~4 对二硫键<sup>[2]</sup>;作用于氯离子通道的毒素 chlorotoxin,含有 36 个氨基酸残基和 4 对二硫键<sup>[3]</sup>;作用于钙离子通道的有两个,一个含 33 个氨基酸残基<sup>[4]</sup>,另一个则由含 27 个氨基酸残基和 104 个氨基酸残基的两条多肽组成的二聚体<sup>[5]</sup>。少数蝎毒素不含二硫键,到目前为止,仅发现了舒缓激肽增效肽及其同源肽和抗菌肽等<sup>[6,7]</sup>少数几种。

东亚钳蝎广泛分布在我国各地。全蝎或蝎尾在中药中被用来治疗癫痫、中风、偏瘫等已有 1000 多年的历史。然而对蝎毒素单组分的研究,最近 10 年来才开始。通过直接从粗毒中分离蛋白或通过基因克隆的方法得到其一级结构的毒素约有 20 余种<sup>[7~15]</sup>。但绝大多数毒素的功能和在通道上的结合位点还不清楚。这主要是因为通过直接从蝎粗毒中分离纯化的方式无法得到足够量的单一蛋白作为研究材料。通过基因工程的方式来表达某一蛋白,不仅可能获得大量的活性蛋白,而且还可以通过定点突变的方法,对多肽进行有目的改造。BmKM4 是蝎毒素中的一个中性哺乳动物神经毒素,其毒性弱于 BmKM1 而比 BmKM8 要强<sup>[15]</sup>。有趣的是,其等电点也介于这两者之间。为了进一步采用对毒素分子进行遗传改造的手段,获得不同等电点的 BmKM4 变异体,以深入研究等电点对其功能的影响,我们首次克隆了其 cDNA。并首次报道中性蝎神经毒素基因。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

东亚钳蝎采自湖北农村;polyAtract mRNA 分离试剂盒购自 Promega 公司;Superscript™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning 试剂盒购自 GIBCO/BRL 公司;NucleonQC 购自 Amersham;其他生化试剂和酶购自 Promega 或华美生物工程公司。

### 1.2 cDNA 文库的构建

将蝎子取毒 3 天后,剪下蝎尾,用“一步抽提法”提取毒腺组织总 RNA;用 polyAtract mRNA 分离试剂盒分离出 mRNA;用 Superscript™ Plasmid System 合成 cDNA,并构建 cDNA 文库<sup>[7~12]</sup>。

### 1.3 PCR 策略分步筛选 cDNA 文库

#### 1.3.1 PCR 引物

根据 BmKM4 氨基酸序列设计并合成引物。正向引物为:5'-CA(TC)TG(TC)GC(TCAG)GGCT(AG)AA(TC)GA(AG)GG-3',对应于 BmKM4 氨基酸序列的第 15~21 位(15HCAGNEG21);反向引物为:5'-GAGCGGC-CGCCCT15-3',由 oligo(dT)15 加部分 Not I 接头引物序列构成。

#### 1.3.2 筛选文库的策略

将 cDNA 文库铺在 LB(AP<sup>+</sup>)平板上,37℃ 培养过夜。将各菌落分别接入加有 0.85ml LB(AP<sup>+</sup>)培养基的 1.5ml Ependorf 管中,于 37℃ 振荡培养 12 h。各加入 0.15ml 甘油,混匀、编号后置 -70℃ 冻存。取 2000 个克隆子作为筛选对象。将它们分成 10 组,每组 200 个克隆,以各组内所有克隆的混合培养物分别作 PCR 模板,利用前述正反向引物进行 PCR 扩增,2.0% 的琼脂糖凝胶检测 PCR 产物,有扩增带的即为阳性组。将阳性组的 200 个克隆再分成 10 组,继续用同样的方式筛选。将得到的阳性组的各克隆分别培养,所得培养物作为各自模板,进行第三轮筛选,即可得到含有目的基因的克隆。

#### 1.3.3 PCR 反应

##### ① 模板的制备

将同组内每个克隆点入同一只 1.5ml 的 Ependorf 管中,加入 1ml LB(AP<sup>+</sup>)培养基,培养后 5000g 离心 5min,去上清,各加入 500μl 双蒸水,在振荡器上混匀,再在沸水中煮 5min,置冰水中冷却,离心后的上清液即可作 PCR 模板。

##### ② PCR 反应条件

PCR 在 95℃ 1min,58℃ 1min,72℃ 1min 的条件下进行,循环 35 次,最后再在 72℃ 延伸 5min。

## 2 结果与讨论

### 2.1 cDNA 文库的筛选

从 2000 个东亚钳蝎毒腺 cDNA 文库克隆子中共筛选到 30 余个阳性克隆子,对其插入片段的大小

进行酶切分析后,选取插入片段最大的 2 个克隆子进行序列分析,得到编码 BmKM4 的全长 cDNA。

## 2.2 BmKM4 cDNA 序列

如图 1 所示,BmKM4 cDNA 由三部分组成:5' UTR、可读框和 3' UTR。可读框长 252bp,编码 84 个氨基酸的毒素前体,它包括 N 端 19 个氨基酸组成的信号肽、中间 64 个氨基酸的成熟毒素(BmKM4)和 C-末端一个额外的碱性氨基酸(Arg)。根据一般规律,C-末端的碱性氨基酸尾将在毒素的成熟过程中被切除,从而使毒素露出天然的 C 末端,并表现出天然活性<sup>[15]</sup>。BmKM4 前体信号肽富含疏水性氨基酸,以连串的 Leu 为主组成了

一个疏水核心。信号肽的切割位点位于中性小分子氨基酸 Ser 的右侧,其-2 位置为酸性氨基酸 Glu,-3 位为 Val。这与绝大多数已报道的蝎毒素前体信号肽一致<sup>[15]</sup>,也完全符合 Von Heijine 法则<sup>[16]</sup>。BmKM4 信号肽与多数短链蝎毒素信号肽不同的是,前者在信号肽 N 端的第二个氨基酸位置有一个带正电荷的氨基酸 Lys,而后者却没有,其第二位是极性氨基酸 Asn。据报道,信号肽 N-端带正电荷的氨基酸可提高所有原核和绝大多数真核生物蛋白质信号肽的输出效率<sup>[17]</sup>。Asn 取代 Lys 对 BmKM4 信号肽功能的影响是一个有趣而值得深入研究的问题。

**GCTTTTCCAGAAAGTTCCTTAAAAACGATTCAAA**

-19	ATG	AAT	TAT	TTG	-15	GTA	ATG	ATC	AGT	TTT	-10	GCA	CTT	CTC	CTA
	M	N	Y	L		V	M	I	S	F		A	L	L	L
	ATG	ACA	GGT	GTG	GAG	AGT	GTT	CGG	GAT	GCT	TAT	ATT	GCC		
	M	T	G	V	E	S	V	R	D	A	Y	I	A		
	AAG	CCC	GAA	AAC	TGT	GTA	TAC	CAT	TGT	GCT	GGA	AAT	GAA		
	K	P	E	N	C	V	Y	R	C	A	G	N	E		
	GGT	TGC	AAC	AAA	TTA	TGT	ACT	GAC	AAT	GGT	GCT	GAG	AGT		
	G	C	N	K	L	C	T	D	N	G	A	E	S		
	GGC	TAT	TGC	CAA	TGG	GGA	GGT	AGA	TAT	GGA	AAT	GCC	TGC		
	G	Y	C	Q	W	G	G	R	Y	G	N	A	C		
	TGG	TGC	ATA	AAG	TTG	CCC	GAT	GAT	GTA	CCG	ATT	AGA	GTA		
	W	C	I	K	L	P	D	D	V	P	I	R	V		
	CCA	GGA	AAA	TGT	CAT	CGC	TGA	TAAACCTCAAAAATTA	AAAAACATAAAGAA						
	P	G	K	C	H	R	end								

**TGTTGTCATAAGAAGAAGCTATTAAATAAAATATAAATAATAAAAATTGAAAPoly(A)**

图 1 BmKM4 前体 cDNA 序列及其对应的氨基酸序列

d(A)<sub>n</sub> 或 d(T)<sub>n</sub> 以斜体表示;带下划线的多肽为信号肽;数字表示氨基酸位序;腺苷酸加尾信号 AATAAA 以双横线表示。

Fig. 1 cDNA sequence encoding the precursor of BmKM4 and its corresponding amino acid sequence

The d(A)<sub>n</sub> or d(T)<sub>n</sub> are in italic. The signal peptide is underlined. The amino acid residues of the mature peptide are numbered from its NH<sub>2</sub>-terminus. The poly(A) signals (AATAAA) are underlined twice.

BmKM4 cDNA 5' UTR 和 3' UTR 分别长 33bp 和 126bp。5' UTR 与东亚钳蝎已知哺乳动物神经

毒素之 5' UTR 几乎完全一致,说明这些基因具有相似的翻译起始调控机制。BmKM4 cDNA 5' UTR

含有数个  $d(A)_n$  或  $d(T)_n$  ( $n > 3$ ) 短序列, 推测其负责维持启动子的稳定弯曲 (stable bending)<sup>[18]</sup>。AUG 的旁侧序列为 AAAATGAA, 这也是绝大多数东亚钳蝎毒素 cDNA 的共有序列<sup>[7~12]</sup>, 它对毒素多肽翻译起始调控的意义有待于深入研究。BmKM4 3' UTR 与其他东亚钳蝎哺乳动物毒素基因的相应序列同源则较低。据报道, 真核 mRNA 3' UTR 在基因表达调控中起重要作用, 它可控制 mRNA 的降解速率, 并可调控 mRNA 翻译的时间和地点<sup>[19]</sup>。因此, 东亚钳蝎中不同的哺乳动物神经毒素基因之间 3' UTR 的差异可能是导致相应毒素蛋白在粗毒中含量差异的关键因素。在 BmKM4 mRNA poly(A) 尾上游 17nt 处, 有一典型的腺苷化信号(AATAAA)。其腺苷化位点左侧是 G, 而绝大多数蝎哺乳动物毒素 mRNA 腺苷化位点左侧是 T 或 C<sup>[14]</sup>。

BmKM4 是一个中等毒性的哺乳动物神经毒素, 其等电点接近中性<sup>[5]</sup>。BmKM4 cDNA 的克隆不仅为揭示真核生物基因表达调控机制积累了资料, 而且为通过遗传修饰的手段获得一系列毒素多肽突变体, 进而研究其结构与功能的关系打下了基础。

#### 参 考 文 献 (References):

- [1] Possani L D, Becerril B, Delepierre M, *et al.* Scorpion toxins specific for  $Na^+$ -channels [J]. *Eur. J. Biochem.* 1999, 274: 287~300.
- [2] Possani L D, Selisko B, Gurrola G, *et al.* Structure and function of scorpion toxins affecting  $K^+$  channel. In *Perspective in Drug Discovery and Design* [M] (Carbon H. and Sebatier J. M. eds), Kluwer Academic Publisher, Holland. 1999, Vol. 15/16, pp. 15~40.
- [3] DeBin J A, Maggio J E, Strichartz G R, *et al.* Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion [J]. *Am J Physiol.* 1993, 264: C361~C169.
- [4] Zamudio F Z, Gurrola G B, Arevalo C, *et al.* Primary structure and synthesis of imperatoxin A (IpTxa), a peptide activator of  $Ca^{2+}$  release channels/ryanodine receptors [J]. *FEBS Letters.* 1997, 405: 385~389.
- [5] Zamudio F Z, Conde R, Arevalo C, *et al.* The mechanism of inhibition of ryanodine receptor channels by imperatoxin, a heterodimeric protein from the scorpion *Pandinus imperator* [J]. *J Biol Chem.* 1997, 272: 11886~11894.
- [6] Torres-Larios, Gurrola G B, Zamudio F Z, *et al.* Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus az-*

- tecus* [J]. *Eur J Biochem.* 2000, 267(16): 5023~5031.
- [7] Zeng X C, Li W X, Peng Fang, *et al.* Cloning and characterization of a novel cDNA sequence encoding the precursor of a novel venom peptide (BmKbpp) related to a bradykinin-potentiating peptide from Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch [J]. *IUBMB Life.* 2000, 49(3): 207~210.
- [8] Zeng X C, Li W X, Zhu S Y, *et al.* Cloning and characterization of the cDNA sequences of two venom peptides from Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch (BmK) [J]. *Toxicon.* 2000, 38: 893~899.
- [9] Zeng X C, Li W X, Zhu S Y, *et al.* Cloning and characterization of a cDNA sequence encoding the precursor of chlorotoxin-like peptide from the Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch [J]. *Toxicon.* 2000, 38: 1009~1014.
- [10] Zeng X C, Zhu Z H, Li W X, *et al.* Molecular cloning and genomic organization of a  $K^+$  channel toxin from Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch [J]. *Toxicon.* 2001, 39(2/3): 407~410.
- [11] Zeng X C, Li W X, Zhu S Y, *et al.* Molecular cloning and sequence analysis of cDNAs encoding a  $\beta$ -toxin-like peptide and two MkTx I homologues from scorpion *Buthus martensii* Karsch [J]. *Toxicon.* 2001, 39(2/3): 225~232.
- [12] 曾宪春, 李文鑫, 朱智慧, 等. 一个新的东亚钳蝎毒素 (BmKT1) 全长 cDNA 的克隆和分析 [J]. *中国生物化学与分子生物学学报.* 2000, 16(5): 53~56.
- [13] Xiong Y M, Zheng Dao Lan, Miao Wang, *et al.* Molecular characterization of a new excitatory insect neurotoxin with an analgesic effect on mice from the scorpion *Buthus martensii* Karsch [J]. *Toxicon.* 1999, 37: 1165~1180.
- [14] Xiong Y M, Ling M H, Lan Z D, *et al.* The cDNA and genomic sequences of a mammalian neurotoxin from the scorpion *Buthus martensii* Karsch [J]. *Toxicon.* 1997, 35: 1025~1031.
- [15] Luo M J, Xiong Y M, Wang D C, *et al.* Purification and sequence determination of a new neutral mammalian neurotoxin from the scorpion *Buthus martensii* Karsch [J]. *Toxicon.* 1997, 35: 723~731.
- [16] Von Heijne G. Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites [J]. *Eur J Biochem.* 1983, 133: 17~21.
- [17] Martin-Eauclaire M F, Ceard B, Ribeiro A M, *et al.* Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of a cDNA encoding the main neurotoxin from the venom of the South American scorpion *Tityus serrulatus* [J]. *FEBS Lett.* 302: 220~222.
- [18] Delabre M L, Pasero P, Marilley M, *et al.* Promoter structure and Intron-Exon organization of a scorpion  $\alpha$ -toxin gene [J]. *Biochemistry.* 1995, 34: 6729~6736.
- [19] Chen C Y A, Shyu A B. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation [J]. *TIBS.* 1995, 20(11): 465~470.