

织锦芋螺 ω 家族芋螺毒素的序列分析*

于芳 卢柏松 赵东 黄培堂**

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

摘要 为了从织锦芋螺(*Conus textile*)中尽可能多地分离出 ω 家族的毒素序列和研究其应用价值,在克隆了织锦芋螺 α 芋螺毒素的基础上进行了织锦芋螺 ω 家族芋螺毒素基因的分离工作。从织锦芋螺毒管中提取mRNA,通过RACE(rapid amplification of cDNA ends, cDNA末端的快速扩增)-PCR方法扩增获得 ω 家族芋螺毒素cDNA片段,并进行克隆和序列分析。从织锦芋螺毒液中获得了6种新的芋螺毒素序列,且毒素序列的成熟肽部分均符合C-C-CC-C-C的保守半胱氨酸框架。这些是新的 ω 家族芋螺毒素序列,新序列的阐明为进一步研究其生物活性和应用打下了基础。

关键词 织锦芋螺, RACE-PCR, ω 家族芋螺毒素

Cloning of ω -Family Conotoxin Sequences from *Conus textile* Venom Duct

YU Fang, LU Baisong, ZHAO Dong, HUANG Peitang

(Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071)

Abstract Omega-conotoxins are specific blocks of voltage-sensitive calcium channels, and a group of most important toxins of conotoxins. Recent studies have found that there are more than ten small peptides with biological activity from *Conus textile* venom duct. But, only several of them have been sequenced. Objective is to obtain new conotoxin sequences from *Conus textile* picked from south ocean of our country and study the potential usage of conotoxin. Using primers corresponding to conserved signal peptide coding region and oligo(dT) which bound to the poly(A) tracts on eukaryotic mRNA, and omega-conotoxin coding cDNA was RACE-PCR amplified. Six new conotoxin sequences were found. The predicted mature peptide sequences belonged to conserved cysteine frame: C-C-CC-C-C. A number of new conotoxins were sequenced and this set the foundation for further investigating their biological activity and application.

Key words *Conus textile*, RACE-PCR, ω -family conotoxin

芋螺是一类海洋软体动物,属腹足纲前鳃亚纲芋螺科,主要通过其毒液快速麻痹被捕者来获取食物。芋螺根据其食性可分为三类:食鱼性、食螺性和食虫性芋螺,其中食鱼性芋螺的毒素对人和哺乳动物毒性较大。其毒性都能专一地阻断神经-肌肉系统的关键传导部位,如作用于神经或肌肉的乙酰胆碱受体(α 芋螺毒素)、钙通道受体(ω 芋螺毒素)和钠通道受体(μ , δ 和 κ 芋螺毒素)等。其中 ω 芋螺毒素有专一性阻断电压敏感型钙离子通道的作用^[1],从而影响神经末梢递质的释放,目前已在研究其在缺血性神经保护^[2]和治疗顽固性疼痛^[3]中的作用。

对不同芋螺的芋螺毒素cDNA文库筛选工作表明,不同芋螺的 ω , δ 和 μ 芋螺毒素成熟肽虽然除

了半胱氨酸保守外,其余氨基酸变异极大,但其信号肽序列却十分保守。Fig 1是目前文献报道的从不同种芋螺中得到的几种不同芋螺毒素的cDNA序列。可见信号肽编码部分除了个别位置存在多态性外,其余位置十分保守,这就为我们采用RACE(rapid amplification of cDNA ends, cDNA末端的快速扩增)方法分离 ω 家族芋螺毒素序列提供了可能。

* 国家海洋863资助项目(819-06-04)

** 联系人 Tel: (010)66948801, Fax: (010)63833521

于芳,女,1972年8月生,助理实验师

收稿日期:1998-12-26,修回日期:1999-03-18

MrVIB	ATGAAACTGCGTGCATGATGATCGTTGCTGTGCTGTTCTTGAC
CTKK0CT	ATGAAACTGCGTGCATGATGATCGTTGCTGTGCTGTTCTTGAC
CTKK1CT	ATGAAACTGCGTGCATGATGATCGTTGCTGTGCTGTTCTTGAC
CTKK2CT	ATGAAACTGCGTGCATGATGATCGTTGCTGTGCTGTTCTTGAC
PVIA	ATGAAACTGCGTGCATGATGATCGTTGCTGTGCTGTTCTTGAC
PVIIA	ATGAAACTGCGTGTGTGATGGTCGTCGGTGCTGTTCTTGAC
GVIA	ATGAAACTGCGTGTGTGATGGTCGTCGCCGTGCTGTTCTTGAC

Fig 1 Nucleic acid sequences of signal peptide of known conotoxin

织锦芋螺虽属食螺性芋螺,但其对人也有较大毒性,历史上曾有记载因织锦芋螺对人的叮咬而中毒死亡的实例 R.Newcomb 等人曾采用传统的生化分离手段发现织锦芋螺毒液中含有数十种毒素^[4],但他们未能阐明其序列和生物活性 目前从织锦芋螺中已分离到了两种新的 α 芋螺毒素序列和6种新的 σ 家族芋螺毒素 与已知织锦芋螺中的 σ 家族芋螺毒素 Tx IA、Tx IB、Tx VII、Tx VIA、Tx VIIA、KK-Q、KK-1、KK-2等相比,序列成熟肽部分具有相同的半胱氨酸框架(C-C-CC-C-C). 本文主要报道采用 RACE-PCR 方法从我国南海产织锦芋螺毒管 cDNA 中获得 σ 家族芋螺毒素序列的初步结果

1 材料和方法

1.1 织锦芋螺: 采自我国海南三亚, -70 保存

1.2 mRNA 的分离: 采用 Invitrogen 的 Fast Track 2.0 kit mRNA Isolation Kit

1.3 反转录: 采用 Pharmacia Biotech 的 Time Saver cDNA Synthesis Kit 试剂盒, 反转录引物 RAP 5'端加上人工设计的引物与 mRNA 3'端 PolyA 配对, 随后 PCR. 在94 4 min 后, 采用逐步退火法, 从65 到42 , 使引物与mRNA 完全退火, 并在42 时加AMVRT 反转录酶进行反转录反应 RAP 引物: 5'-GGCCACGCGTCGACTA G TACT⁽¹⁸⁾ (G/A/C)N-3

1.4 PCR 引物: 分别与 σ 家族芋螺毒素的信号肽编码部分和 cDNA 3'末端人工加上去的引物配对 PO5: 5'-TATGAAACTGACGTG (C/T) (A/G) TG-3, 对应信号肽编码部分;

UAP 引物: 5'-GGCCACGCGTCGACTA G TACT-3, 同RAP 引物的人工合成部分均由本所合成

1.5 所用工具酶和其它实验材料: Taq DNA 聚合酶和 Vent DNA 聚合酶分别购自华美生物工程公司

和 BioLabs 公司; T 载体连接试剂盒, 购自 Promega 公司; 限制性内切酶 Sac I 和 Apa I 均为 GBCO 公司产品 大肠杆菌 DH 5 α 为本组保存

1.6 PCR 扩增^[10]: 按常规反应条件, 反应体积为20 μ l 采用热启动, 之后进行 PCR 扩增反应 循环参数为94 变性4 min 后, 94 30 s, 50 30 s, 72 30 s, 共25个循环

耐热DNA 聚合酶采用 Taq \cdot Vent= 100:1, 以提高忠实性

1.7 PCR 产物的纯化: 采用 Promega 的 Wizard PCR Preps Kit 纯化 PCR 产物, 供连接用

1.8 PCR 产物的连接: 与 T 载体在4 连接过夜之后转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 筛选氨苄抗性菌落, 质粒提取和酶切鉴定参照文献[11]进行

1.9 克隆质粒DNA 的纯化: 采用 QIAGEN 公司的 QIAprep Spin Mini Kit 质粒纯化试剂盒纯化克隆质粒以供序列分析

1.10 克隆质粒的测序: 采用 Applied Biosystems 373A DNA Sequencer 进行DNA 自动序列分析

2 结果

2.1 σ 家族芋螺毒素基因的 PCR 扩增

据文献报道, 从不同芋螺中分离的 σ 家族芋螺毒素基因的信号肽序列具有保守性, 其 cDNA 可以采用针对这些保守区域设计的引物来扩增 我们首先采用 P05引物与 dT18扩增, 确实能够得到约400 bp 的产物, 说明反转录是成功的, 但扩增产物特异性不高, 同时存在大量非特异产物, 而且 PCR 条件也不好掌握, 于是采用 RACE (cDNA 末端快速扩增)-PCR 方法, 在50~ 65 之间退火即可得到特异产物, 如 Fig 2 PCR 产物经纯化后连接到 T 载体中去供测序分析

3 讨 论

在 PCR 扩增中, 会有错误参入, 我们将 Taq DNA 聚合酶和 *Vent* DNA 聚合酶按 100:1 混合参入反应, 能够提高 PCR 反应的忠实性。其次, 采用的 PCR 反应的循环参数不超过 25 个循环, 加上 cDNA 片段很短, 也降低了错误参入的概率。从实验结果可以看出, 不同批次 PCR 扩增产物得到的序列完全一样, 说明获得的序列具有较高的可信度。

已有芋螺毒素 cDNA 序列告诉我们, 其信号肽和原肽编码部分相对保守, 成熟肽变化较大, 这为我们采用 RACE 方法提供了方便。但我们不能肯定所设计的引物 P05 能够扩增织锦芋螺所有的 *o* 家族芋螺毒素。就从文献报道新发现的 *o* 家族 cDNA 的序列来看仍未超出我们所设计的引物范围。因此, 信号肽编码尽管保守, 但与别的芋螺 *o* 家族芋螺毒素信号肽序列和原肽序列比较, 它仍是特定种芋螺毒素的标签。

致谢: 感谢防化研究院助理研究员刘娟同志和本所张京生老师对本项工作给予的帮助!

References

- 1 戴秋云, 陈添弥, 黄翠芬. *ω* 芋螺毒素研究进展. 军事医学科学院院刊 (Dai Qiuyun, Chen Tianmi, Huang Cuifen. Progress of study on *ω* conotoxins *Bull Acad Mil Med Sci*), 1997, **21** (3): 223~ 227
- 2 Valentino K, Newcomb R, Gadbois T, Sing T, Bowersox S, Bitner S, Justice A, Yamashiro D, Hoffman B B, Ciaranello R. A selective N-type calcium channel antagonist protects against neuronal loss after global cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (16): 7894~ 7897
- 3 Leveque C, Hoshino T, David P, Shoji-Kasai Y, Leys K, Omori A, Lang B, el Far O, Sato K, Martin-Mouton N. The synaptic vesicle protein synaptotagmin associates with calcium channels and is a putative Lambert-Eaton myasthenic syndrome antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 3625
- 4 Newcomb R, Gaur S, Bell JR, Cruz L. Structural and biosynthetic properties of peptides in cone snail venoms. *Peptides*, 1995, **16** (6): 1007~ 1017
- 5 黄培堂, 俞炜源, 陈添弥等译. PCR 技术实验指南. 北京: 科学出版社, 1998: 268~ 286 (Dieffenbach C W, Dveksler G S. *PCR Primer: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)
- 6 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Ed). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 1. 1~ 5. 89
- 7 Fainzilber M, Lodder J C, vander Schors R C, Li K W, Yu Z, Burlingame Geraerts W P, Kits K S, et al. A novel hydrophobic omega-conotoxin blocks molluscan dihydropyridine-sensitive calcium channels. *Biochemistry*, 1996, **35** (26): 8748~ 8752

1 戴秋云, 陈添弥, 黄翠芬. *ω* 芋螺毒素研究进展. 军事医学科学院