

尖吻蝮蛇未知 C 类凝集素 蛋白 cDNA 扩增、克隆与表达

查向东^{1)*} 张华远²⁾ 肖亚中¹⁾ 刘 兢¹⁾ 徐康森²⁾

(¹⁾中国科学技术大学生命科学学院, 合肥 230036; (²⁾中国药品生物制品检定所生化与基因工程药物研究室, 北京 100050)

摘要 蛇毒中 C 类凝集素 (C-TLs) 超家族蛋白, 是具有抗凝血等功能的一族蛋白质. 根据测得的蛇毒蛋白的 N 端氨基酸序列, 设计 PCR 引物; 从湖南尖吻蝮蛇毒腺中提取总 RNA, 经反转录, 再通过温度降落锚式 PCR, 在只使用一个特异性引物和一个通用引物、进行一次循环数不超过 30 的非巢式反应的条件下, 即获得两个较为清晰的扩增条带; 其中之一带经克隆、测序、比较, 证明其与已知的蛇毒中 C 类凝集素超家族蛋白质有较高的同源性. 在大肠杆菌中获得高效融合表达, 融合蛋白占细胞总蛋白的 26%~30%.

关键词 尖吻蝮蛇, C 类凝集素超家族, 温度降落锚式 PCR, 融合表达, agkisasin

学科分类号 Q781

蛇毒中存在许多与凝血或溶血有关的酶类. 象 agkicetin^[1]、bothroalternin^[2]、因子 IX/X 结合蛋白^[3]、bothrojaracin^[4]等, 与 C 类凝集素的 CRD (碳水化合物识别结构域) 同源, 故属 C 类凝集素超家族; 相互间一级结构彼此类似, 存在的差异又常使得它们在生物活性和作用机理上有所不同^[5]. 目前, 蝮蛇蛇毒中该家族成员的多样性、结构与功能的关系等方面, 仍未十分明了. 因此, 一方面需要对现有已知序列结构和功能的关系进行深入研究, 挖掘新的功能; 另一方面也要继续寻找新的有价值的成分, 对有潜在医疗价值成员的基因进行有效的开发与利用, 以更好地造福于人类.

本试验在已知 N 端氨基酸序列的情况下, 用改良的 RT-PCR 方法, 成功地分离出该家族的一个新的成分, 并进行克隆、分析和获得高效融合表达.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 中国湖南尖吻蝮蛇活蛇系河南驻马店济南军区血站提供.

1.1.2 克隆载体质粒 pGEM-T 和 *E. coli* JM109 菌株购自 Promega 公司. TaqDNA 聚合酶购自华美生物工程公司. 总 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、质粒快速抽提试剂盒等购自北京博大泰克生物技术有限公司. DNA 凝胶回收采用生命技术公司的 ConcertTM Gel Extraction Systems. 表达载体 pBAD/Thio-TOPO 及宿主菌 *E. coli* TOP10 购自 Invitrogen 公司.

1.1.3 蛇毒蛋白样品由昆明动物研究所肖昌华教授提供.

1.2 方法

1.2.1 蛇毒蛋白 N 端 15 个氨基酸的序列, 系由北京大学生命科学院用 Edman 降解法在 491 protein sequence 上测得;

1.2.2 蛇毒腺总 RNA 的提取: 将尖吻蝮蛇在铁笼内电击致死, 立即切下蛇头, 分离出毒腺, 迅速置于干冰中临时保存, 随后转移到液氮中较长时间保存备用. 总 RNA 的抽提参照博大泰克公司相关说明.

1.2.3 cDNA 合成: 按试剂盒推荐方法操作.

1.2.4 DNA 序列测定: 由大连宝生物工程有限公司完成.

1.2.5 引物合成: 由上海生工生物工程公司合成
P1: GAT TGT CCX TCT GAY TGG TCC TCZ TA
X= A, C, T; Y= C, T; Z= C, T.

P2: TAT GAA GGG CAT TGC TAC A

P3: TGC CTG GAA CTC GCA GAC

以及 oligod (T)₂₀.

2 结果和讨论

2.1 PCR 扩增

根据 N 端 15 个氨基酸的序列 DCPSDWSS-YEGHCYK, 参考尖吻蝮蛇中不同密码子出现的频

* 通讯联系人.

Tel: 010-67017755-576, E-mail: xdcha@263.net

收稿日期: 2001-03-15, 接受日期: 2001-05-17

率, 设计了简并引物 P1 和引物 P2. 但当用巢式 anchored PCR^[6] 试图扩增时, 发现因循环数过多、要求两个以上的引物、出现弥散条带或高分子质量条带^[7] 等问题或缺陷, 其效果并不理想. 为此, 我们考虑到将温度降落法^[8] 运用于锚式 PCR, 以求在反应初期即扩大目的片段所占比例, 减少非特异性扩增; 同时, 随着退火温度的降低, 亦能较好地解决特异引物与非特异引物 T_m 值不平衡的矛盾. 为此尝试了两种方法: 其一为温度不连续递减, 即在 PCR 反应初始阶段, 每隔两个循环, 退火温度下降 2 °C, 直到最后的二十多个循环皆维持一个较低的退火温度. 其二与上法类似, 为温度穿梭递减, 在上述每两个循环间隔中, 另增加一次低退火温度的循环.

结果显示在只使用一个特异引物 (引物 1) 和 oligodT₂₀、进行一次 PCR 反应的情况下, 获得了两条较为清晰的扩增带. 其中不连续递减法不仅较为简单, 条带也更为清晰 (图 1).

由于对 C 端氨基酸序列的测定技术相比较而言不够成熟, 因此在研究中常常遇到仅知 N 端部分氨基酸序列而又要分离出目的基因的问题. 故该方法有一定的普遍意义. 使用该方法的另一优点是无需构建 cDNA 文库, 仅要求改变退火温度, 而这种不连续的退火方法在一般 PCR 循环仪上都能实现. 虽不能确定所获得的每一条带都是均质的, 但至少目标片段在条带中应占极大的优势 (克隆、测序的结果证实了推测); 也有助于发现结构上互相关似特别是末端类似的功能基因, 并能较为完整地

了解 3'-UTR 的序列信息. 对上述另一未知条带的分析鉴定亦在进行, 很有可能发现另一新的相关成分.

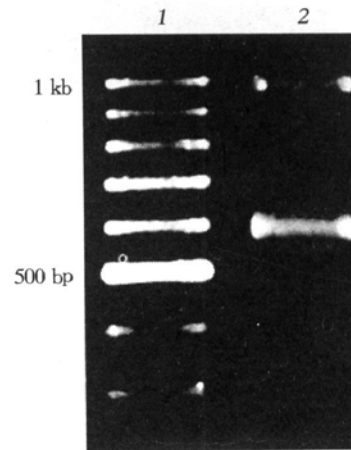


Fig. 1 Amplifying cDNA with touch-down anchored PCR method

1: 100 bp DNA ladder; 2: PCR products.

2.2 克隆与测序

根据现有的有关该蛇毒蛋白质分子质量的信息, 首先选择前带, 用 DNA 凝胶回收试剂盒回收. 用 T/A 克隆法将回收的 PCR 产物片段克隆到载体质粒中. 在含氨苄青霉素的 LB 平皿上随机挑选 5 个白色菌落, 摇菌并抽提质粒; 经 PCR 鉴定, 确认皆插入了大小约为 500~600 bp 的片段. 测序表明该 5 个克隆具有完全相同的核苷酸序列 (GenBank 中登记号为 AF350324):

```
GATTGTCCTTCTGATTGGTCCTTATGAAGGGCATTGCTACAAGCCCTTCAATGAACTG
D C P S D W S S Y E G H C Y K P F N E L
AAAAACTGGGCGGATGCAGAGAATTTCTGCACACAACAGCACACAGGCAGCCATCTGGTC
K N W A D A E N F C T Q Q H T G S H L V
TCCTTCCAGAGCACGGAAGAAGCAGATTTTGTGGTCAAGCTGGCCTTCCAAACTTTTGAC
S F Q S T E E A D F V V K L A F Q T F D
TACGGTATTTTCTGGATGGGACTGAGCAACATCTGGAACCAATGCAACTGGCAATGGAGC
Y G I F W M G L S N I W N Q C N W Q W S
AATGCTGCCATGCTCAAATACACAGACTGGGCTGAAGAGTCGTATTGTGTCTATTTCAAG
N A A M L K Y T D W A E E S Y C V Y F K
TCAACTAATAACAAATGGAGGAGTATAACCTGCAGAATGATAGCAAATTTTCGTCTGCGAG
S T N N K W R S I T C R M I A N F V C E
TTCCAGGCA TAGTCTGAAGATGCAGCTGAGTGAAGTCTGGAGAAGCAAGGAAGTCCCCA
F Q A
GCCACCCCCACCTGCCGCTATCTCTGCTGTGCACCCTTCACTGGCTCAACGGATGCTC
TCTGTAGCTGGATCTGTTTTTCTGCTCCTGATGGGCCAGAAGGTCCAATAAATTCTGCC
TAGCATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

通过 NCBI 光盘检索, 证实根据 DNA 推导的多肽序列具有与 C 类凝集素 CRD 同源的结构.

在已知序列中选择来自不同种属的几个成员进行多序列同源比较, 结果见图 2.

deduced peptide	DCPSD	WSSYEGHCYK	PFNELKNWAD	50		
convulxin β	MGRFIFVSFG	LLVVFLSLSG	SEAGFCCPSH	WSSYDRYCYK	VFKQEMIWAD	
IX/X - bp β	MGRFIFMSFG	FLVVFLSLSG	. . TAADCPSD	WSSYEGHCYK	PFSEPKNWAD	
aggrexin β	MGRFIFVSFG	LLVVFLSLSG	. . TGADCPSG	WSSYEGHCYK	PFNEPKNWAD	
deduced peptide	AENFCTQQHT	GSHLVSFQST	EEADFFVVKLA	FQIFDYGIFW	MGLSNIWNQC	100
convulxin β	AEKFCCTQQHT	GSHLVSFHST	EEVDFVVKMT	HQSLKSTFFW	IGANNIWNKC	
IX/X - bp β	AENFCTQQHA	GGHLVSFQSS	EEADFFVVKLA	FQIFGHSIFW	MGLSNVWNQC	
aggrexin β	AERFCKLQPK	HSHLVSFQSA	EEADFFVVKLT	RPRLKANLVW	MGLSNIWHGC	
deduced peptide	NWQWSNAAML	KYTDWAEESY	CVYFKSTNNK	WRSITCRMJA	NFVCEFQA	148
convulxin β	NWQWSXGTKP	EYKEWHEEFE	CLISRTFDNQ	WLSAPCSDTY	SFVCKFEA	
IX/X - bp β	NWQWSNAAML	RYKAWAEESY	CVYFKSTNNK	WRSRACRMMA	QFVCEFQA	
aggrexin β	NWQWSXGARK	NYKDWQEQSE	CLAFRGVHIE	WLNMDCSSTC	SFVCKFKA	

Fig. 2 Multiple alignment of the peptide deduced from the cDNA and several other C-type lectin superfamily proteins from different snake species

Convulxin β chain, IX-X-bp β chain, Aggrexin β chain were isolated from venom of *Crotalus durissus terrificus*, *Trimeresurus flavoviridis* and *Calloselasma rhodostoma* respectively. The identical segments are highlighted by bold facing.

相似区段在 C 端的分布相对稀疏. 另根据两两比较的结果, 在所有已知序列中, 与因子 IX/X 结合蛋白 β 链同源性最高, 为 90%; 与 aggrexin β ^[9]、convulxin β ^[10] 的同源分别为 60% 和 54%. 而与同样发现于尖吻蝮蛇的 agkisacutacin 同源程度也仅为 59%. 为进一步探讨蛇毒中该类成分分子进化规律以及结构与功能的关系, 有必要测定相应基因组 DNA 的碱基序列, 以了解内含子、外显子的组成信息.

2.3 高效融合表达

根据测序结果设计下游引物 P3. 以 P1 和 P3 为引物, 以上述插入了目标 cDNA 的 pGEM-T 载体为模板, 再进行 PCR 扩增. 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳并回收后, 与 pBAD/Thio-TOPO 表达载体连接, 在 *E. coli* TOP10 菌株中用阿拉伯糖诱导其表达. 细胞沉淀经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 检测, 有一诱导表达产物条带 (图 3), 分子质量大约为 29~30 ku, 与预期吻合. 用 0.2%、0.02%、0.002% 三种阿拉伯糖终浓度分别诱导 4、5、6 和 6.5 h, SDS-PAGE 结合凝胶成像系统分析表明, 表达量未有很大变化, 融合蛋白约占细菌总蛋白的 26%~30%.

已经发现的该家族成员都有一定的生物活性和药效, 如 convulxin 促进血小板聚集、bothroalternin 为凝血酶抑制因子, 等等; 且因为该 cDNA 的模板 mRNA 在毒腺组织中似有较高的丰度, 初步推测其

对应的多肽也应该有潜在的生理活性和药用价值, 我们拟将其命名为 agkisasin. 一方面, 该 cDNA 序列与所提供的原蛇毒蛋白一级结构对应关系尚有待质谱测序证实; 另一方面, 表达产物的分离纯化及活性鉴定也已进行 (结果另文发表).

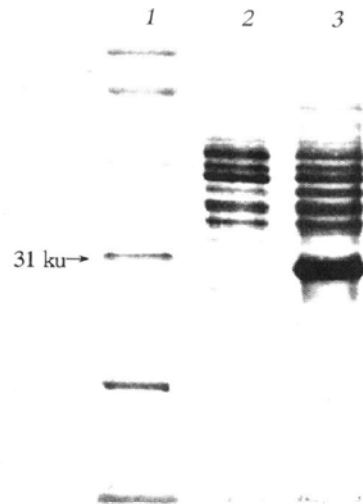


Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the fusion protein expression in *E. coli*

1: molecular mass standards; 2: zero time control; 3: induction with 0.02% arabinose for 4 h.

参 考 文 献

1 Chen Y L, Tsai I H. Functional and sequence characterization of agkicetin, a new glycoprotein Ib antagonist isolated from

- Agkistrodon acutus venom, *Offf2p4*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **210** (2): 472~ 477
- 2 Castro H C, Fernandes M, Zingali R B. Identification of bothrojaracin-like proteins in snake venom from *Bothrops* species and *Lachesis muta*. *Toxicon*, 1999, **37** (10): 1403~ 1416
 - 3 Ryoichi M, Eiji Y, Manabu Y, *et al.* cDNA cloning of IX/X-bp, a heterogeneous two chain anticoagulant protein from snake venom. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **220** (2): 382~ 387
 - 4 Arocas V, Castro H C, Zingali R B, *et al.* Molecular cloning and expression of bothrojaracin, a potent thrombin inhibitor from snake venom. *Eur J Biochem*, 1997, **248** (2): 550~ 557
 - 5 Cheng Xin, Qian Y W, Liu Q D, *et al.* Purification, characterization, and cDNA cloning of a new fibrinolytic venom protein, Agkisacutacin, from *Agkistrodon acutus* venom. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **265** (2): 530~ 535
 - 6 奥斯伯 F 著. 颜子颖, 王海林译. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 1998. 611~ 613
 - 7 Bell D A, Demarini D M. Excessive cycling converts PCR products to random-length higher molecular weight fragments. *Nucleic Acids Res*, 1991, **19** (18): 5079~ 5080
 - 8 迪芬巴赫 C W, 德维克斯勒 G S. 黄培堂, 俞炜源, 陈天弥等译. PCR 技术实验指南. 北京: 科学出版社, 1998. 33~ 36
 - 9 Dieffenbach C W, Dvekler G S, Huang P T, Yu W Y, Chen T M, *et al.* translated. PCR Primer: A Laboratory Manual. Beijing: Science Press, 1998. 33~ 36
 - 9 Huang T F, Liu C Z, Yang S H. Aggretin, a novel platelet-aggregation inducer from snake (*C. rhodostoma*) venom, activates phospholipase C by acting as a Ia/IIa antagonist. *Biochem J*, 1995, **309** (Pt3): 1021~ 1027
 - 10 Leduc M, Bon C. Cloning of subunits of convulxin, a collagen-like platelet-aggregating protein from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Biochem J*, 1998, **333** (Pt 2): 389~ 393

Amplifying, Cloning and Expression of the cDNA Encoding an Unknown C-type lectin Superfamily Protein from *Agkistrodon acutus*

ZHA Xiang-Dong^{1)*}, ZHANG Hua-Yuan²⁾, XIAO Ya-Zhong¹⁾, LIU Jing¹⁾, XU Kang-Sen²⁾

¹⁾School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230036, China; ²⁾Laboratory of Biochemical and Gene Engineering Drugs, National Institute for Control of Pharmaceuticals and Biological Products, Beijing 100050, China)

Abstract C-type lectin superfamily in snake comprises a group of proteins which display anticoagulation or various other functions. PCR primers were designed according to N-terminal sequence of a snake venom protein of which the complete amino acid sequence had been unknown. Total RNA was extracted from venom gland of *Agkistrodon acutus* from Hunan Province, and was reversely transcribed to cDNA. Then by applying the touchdown method to anchored-PCR, with only one specific and one universal primer, two relatively distinct bands were amplified in a single non-nested PCR reaction of no more than 30 cycles. Cloning and sequencing indicated that the sequence is homologous with other members of the C-type lectin superfamily in snake. High level fusion expression in *E. coli* was achieved, with the fusion protein accounting for 26% ~ 30% of total proteins.

Key words *Agkistrodon acutus*, C-type lectin superfamily, touchdown anchored-PCR, fusion expression, agkisasin

* Corresponding author. Tel: 86-10-67017755-576, E-mail: xdcha@263.net

Received: March 15, 2001 Accepted: May 17, 2001