

蝎毒素基因分子生物学研究进展*

朱顺义 李文鑫¹⁾

(武汉大学生命科学院, 武汉 430072)

摘要 介绍了克隆蝎毒素 cDNA 和基因组基因的策略以及蝎毒素 cDNA 的结构和毒素蛋白前体的翻译后加工过程, 同时综述了蝎毒素基因组基因的组织结构及其 mRNA 前体的加工以及重组蝎毒素基因表达的研究进展.

关键词 蝎毒素, cDNA, 基因克隆, 分子生物学

学科分类号 Q78

蝎毒素 (scorpion toxin) 是一些多肽类物质, 一般含 30~70 个氨基酸残基及 3~4 对二硫键^[1]. 这类毒素特异性地作用于哺乳动物、昆虫和甲壳类动物神经组织的离子通道. 药理学上将蝎毒素分为四类, 即 α 毒素, β 毒素, 抑制型昆虫毒素和兴奋型昆虫毒素^[2].

蝎毒素是研究蛋白质结构和功能关系的极好模型, 同时它也是神经药理学研究的理想工具, 所以被国内外广泛研究^[3,4]. 总的来说, 60 年代至 80 年代末关于蝎毒素的研究主要集中在分离纯化、结构测定、免疫学以及药理学等方面. 从 80 年代末开始, 蝎毒素蛋白一级结构的确定以及分子遗传学技术的发展, 很大程度上促进了蝎毒素基因分子生物学的研究. 对编码蝎毒素的 cDNA 和基因进行克隆和测序并进行比较, 可以了解真核细胞基因翻译后的加工过程以及基因组织、转录后加工、表达调控和分子进化等基本理论问题; 同时将具有药理活性或昆虫毒性的毒素蛋白 cDNA 或基因引入细胞或动植物体内具有十分重要的应用价值. 本文将就这方面的研究进展做一综述.

1 克隆蝎毒素 cDNA 和基因组基因的策略

1.1 克隆蝎毒素 cDNA 的策略

1.1.1 cDNA 文库策略: 首先构建蝎毒腺组织 cDNA 文库, 根据已知氨基酸序列设计合成寡核苷酸探针筛选文库就可以获得该毒素蛋白的 cDNA 克隆. 该策略是目前分离蝎毒素 cDNA 最常用的方法. 第一个蝎毒素蛋白 AaH II 的 cDNA 就是采用该法获得成功的^[5]. 该策略的优点是成功率较高, 可获得包括 N 端信号肽序列和 C 端额外氨基酸序列在内的全长 cDNA. 但因要构建 cDNA 文库, 所以过程较复杂, 且较费时.

1.1.2 PCR 策略: 根据蝎毒素蛋白 N 端和 C 端序列设计和合成正向和反向引物, 以从毒腺组织 mRNA 反转录的 cDNA 为模板, PCR 扩增出相应于该蛋白的 cDNA. 我国学者最近用此策略克隆出了 *B. martensii* Karsch (BmK) 两个抑制型昆虫毒素 (BmKIT3 和 BmKIT4) 的 cDNA^[6]. 但该方法应用于克隆蝎毒素 cDNA 时存在一个明显的不足, 就是无法获取翻译后加工掉的氨基酸序列 (信号肽和额外氨基酸序列). 鉴于此, Gurevitz 等^[7] 对常规 PCR 作了改进. 他们采用反向 PCR 策略成功地分离了一种 *L. quinquistriatus hebraeus* (Lqh) α 神经毒素的全长 cDNA. 其策略是在 cDNAs 两端加上衔接头, 环化后用作模板进行 PCR, 线性 PCR 产物经补平和 5' 磷酸化后用 T4 DNA 连接酶环化, 再用限制酶消化产生粘性末端, 克隆到载体上.

1.1.3 cDNA 文库与 PCR 相结合的策略: Larabar-Djebari 等^[8] 从 *A. australis* 毒腺组织 cDNA 文库中用简并引物 PCR 扩增出了编码 KTX2 前体的 cDNA. 其策略见图 1. 引物 1 和 4 根据 Okayama-Berg 载体的末端和开始序列设计合成; 引物 2 根

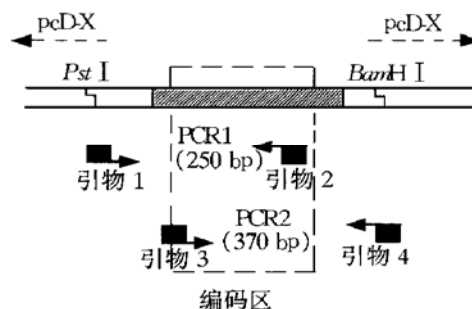


图 1 用于克隆编码 KTX₂ 前体的 cDNA 的策略

* 国家医药技术创新博士基金 (96-901-11-033) 及武汉市晨光计划 (965001037-24) 资助项目.

¹⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1998-04-12, 修回日期: 1998-09-28

据保守区 (Gly25-Asp33) 序列设计合成; 引物 3 根据第 1 次 PCR 获取的包括起始密码子在内的 5' 侧翼区的互补序列设计合成. 我国学者采取相似的策略成功地克隆了两个 BmK 抗哺乳动物神经毒素 cDNA 序列 (BmKM1 和 BmKM9)^[11].

1.2 克隆蝎毒素基因组基因的策略

在获得某一蝎毒素的 cDNA 后, 就有必要克隆出相应的基因组基因来研究这个基因的组织结构, 转录调控机制等问题. 目前, 克隆蝎毒素基因组基因的策略主要依靠 PCR^[9,10], 采用该法已克隆出了数个基因. 利用已知蝎毒素 cDNA 5' 端或 3' 端保守核苷酸序列设计合成引物, 以蝎基因组 DNA 为模板进行 PCR 就能扩增出包括启动子或外显子和内含子在内的全长基因, 测序后与 cDNA 作比较就很容易地分析出该基因的组织结构以及转录调控机制和转录后加工等信息.

另外, 也有人采用构建蝎基因组文库的方法分离蝎毒素基因^[11]. 用已知序列的 cDNA 作探针筛选基因组文库得到阳性克隆, 再用 PCR 对这一 DNA 片段进行分析.

2 蝎毒素 cDNA 及毒素蛋白前体的翻译后加工

1989 年, Bougis 等首次克隆出 *A. australis*

神经毒素的 cDNA. 至今已有几十种蝎类毒素蛋白基因的 cDNA 被克隆和测序, 涉及的蝎种类包括 *A. australis* (Aa)^[5,8], *L. quinquestriatus hebraeus* (Lqh)^[12], *T. serrulatus* (Ts)^[13], *C. noxius* Hoffmann (CnH)^[14] 和 *B. martensii* Karsch (BmK)^[1,6] 等.

根据目前的研究结果可以给出蝎毒素 cDNA 的结构模型 (图 2), 其 ORF 由三部分组成: 5' 端 (N 端) 信号肽序列 (编码 18~22 个氨基酸), 成熟毒素序列 (编码 31~70 个氨基酸) 和 3' 端 (C 端) 额外氨基酸序列. 常见的额外氨基酸序列有: -Gly-Lys-Lys, -Gly-Lys, -Arg-Lys, -Gly-Arg, -Arg. 有些毒素蛋白前体无 C 端额外序列, 如 *A. australis* 的 KTX₂ 蛋白等. 额外氨基酸序列是否与毒素前体加工成成熟毒素蛋白有关还需进一步研究.

通过比较蝎毒素 cDNA 的开放阅读框 (ORF) 和其毒素蛋白质序列就可以获得毒素蛋白翻译后加工机制方面的信息 (图 2). 毒素前体经信号肽酶 (signal peptidase) 切除 N 端信号肽, 羧肽酶 (carboxypeptidase) 切除 C 端额外氨基酸, 有的还要将最末一个氨基酸酰胺化, 才能成为成熟毒素蛋白^[4].

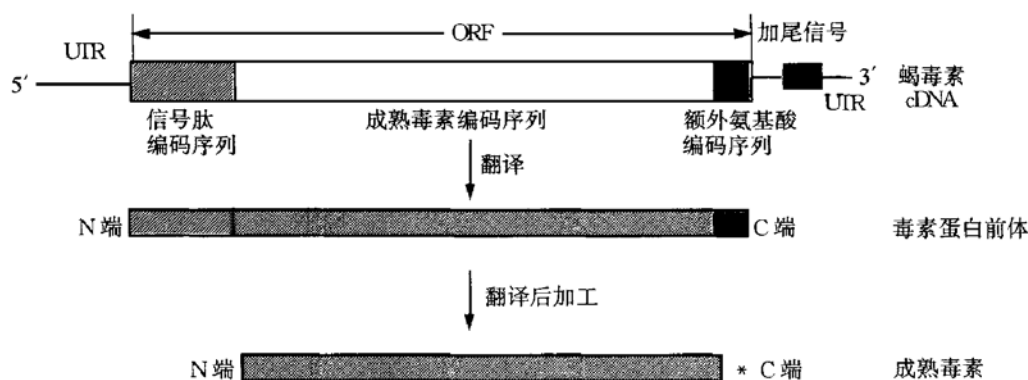


图 2 蝎毒素 cDNA 结构及蛋白质翻译后加工示意图

* 表示 C 端最末一个酰胺化的氨基酸.

3 蝎毒素基因组组织结构及其 mRNA 的加工

蝎毒素基因组基因的研究最早是 Bougis 等 (1989)^[5] 用毒素 AaH II 的 cDNA 作探针与 *A. australis* 基因组杂交, 检测到一 2 800 bp 的 *Eco*R I 片段, 表明 AaH II 毒素基因以单拷贝形式存在. Becerril 等^[15] 首次报道用 PCR 扩增 CnH 基因组 DNA 基因, 并用特异探针与 PCR 产物杂交证实编码 CnH Na⁺ 通道阻断毒素基因不含内含子或至少

内含子很小. 同年, Becerril 等^[16] 根据已报道的 cDNA 序列合成的引物用 PCR 扩增了 *T. serrulatus* γ 毒素基因. 该基因有一个 475 bp 的内含子, 位于毒素前体信号肽序列中间. 1996 年 Becerril 等^[10] 从巴西 *Tityus* 属蝎基因组 DNA 中克隆了三个基因, 二个来自 *T. bahiensis*, 一个来自 *T. stigmurus*, 编码 γ 样肽, 含有一个近 470 bp 的内含子, 这三个基因编码产物毒性相似, 其基因组组织结构, 加工和表达相似. 1996 年 Corona 等^[9]

用PCR扩增了 *T. serrulatus* 毒素 IV-5 基因, 该基因片段由 659 bp 组成, 包括 2 个外显子 (28 bp 和 284 bp) 和 1 个内含子 (347 bp), 后者位于毒素前体信号肽序列中间. 我国科学家采用 PCR 策略, 根据已确定的 BmK cDNA 序列设计合成引物, 用基因组 DNA 为模板克隆出 BmK M1 的基因组基因, 该基因在信号肽编码序列中间有一个 408 bp 的内含子^[17].

Delabre 等^[11]对蝎 α 毒素基因的启动子结构和

内含子-外显子组织作了详细的研究. 他们从基因组中克隆和鉴定了编码毒素 AaH I' 的基因. 基因转录单位长度为 793 bp, 有一个 425 bp 的内含子. 转录起始位点的序列为 AACAA, 启动子上游元件有 CCAAT 框和 TATA 框, 同时, 亦存在转录因子 MAT- α 2, Pit-1 和 IEF1 结合元件.

综合上述研究结果, 可以用图 3 表示蝎毒素基因的组织结构.

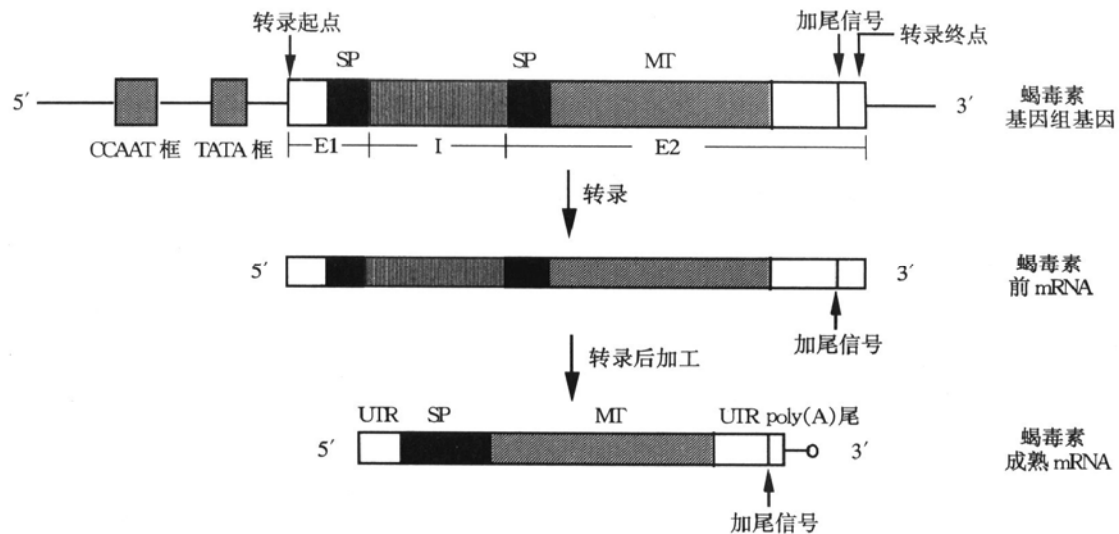


图 3 蝎毒素基因组织结构及其 mRNA 前体加工示意图

E1, E2: 外显子 1, 外显子 2; I: 内含子; SP: 信号肽编码序列; MT: 成熟毒素编码序列; UTR: 非翻译区.

4 重组蝎毒素基因的表达

蝎毒素基因在离体细胞或生物体内的表达, 在理论研究上, 可以比较容易获得高纯度的毒素蛋白用于蛋白质工程 (主要是研究蛋白质结构和功能之间的关系), 神经生物学和免疫学等的研究; 在应用上, 可以培育抗虫植物, 或人工定向突变蝎毒素基因来降低毒素对哺乳动物的毒性而增强杀害虫活性, 同时, 可以用来生产具有重要药理活性的毒素蛋白 (如抗癫痫肽 AEP 等).

早期多采用人工合成的蝎毒素基因作为重组基因, 如 Carbonell 等用合成的 *B. eupeus* 的 BeIt 基因以 AcMNPV 为载体在昆虫 Sf 细胞系中实现了表达. Dee 等^[18]将合成的 *A. australis* 的 AaIT 基因转入 NIH/3T3 细胞, 在人 IL-2 的信号肽引导下, AaIT 毒素蛋白分泌到培养基中, 分泌的毒素对黄热蚊幼虫具毒性而对鼠无毒. 随着蝎毒素基因分子生物学的发展, 人们开始用克隆的蝎毒素基因 (主要是 cDNA) 作为重组基因, 并对蝎毒素基因进行

遗传操作改变毒素蛋白的毒性谱, 如 Zilberberg 等^[19]用定向诱变的策略对克隆的 Lqha IT cDNA 进行人工改造, 获得了比较满意的结果, 为人工改变蝎毒素选择性毒性提供了一条有前途的路线. 同时, 将蝎昆虫毒素基因引入 AcNPV 构建重组杆状病毒杀虫剂具有十分广阔的应用前景^[20].

到目前为止, 已有数种重组蝎毒素基因得以表达, 包括 I5A 基因 (*B. eupeus*)^[19, 21]; AaIT、AaHIT 和 AaHIT₁ 基因 (*A. australis*)^[18~23]; Lqh α IT 基因 (*L. quinquestratus hebraeus*)^[19, 24]; BotX IV 基因 (*B. occitanus tuncetanus*) 等^[2]. 采用的表达载体有: 细菌质粒, 酵母质粒, 杆状病毒, 辛德毕斯病毒, 反转录病毒和植物载体等. 受体细胞或有机体包括 *E. coli*, 酵母, 昆虫细胞, 哺乳动物细胞, 昆虫幼虫和植物等. 最近, 我国学者在分泌型酵母系统中成功表达了 BmK M1 的 cDNA^[25].

目前, 重组蝎毒素基因的表达有两个方面的问题值得考虑. 一是如何提高表达水平. 除了

Bouhaoual-Zahar 等^[2]报道的用细菌表达系统获得 1mg 毒素蛋白每升培养基的表达量外, 其他表达系统的表达水平均较低。表达水平高低受许多因素限制, 但对于蝎毒素来讲, 信号肽序列是一个重要因素, 有报道表明, 采用异源信号肽比采用自身信号肽合成的毒素量要低。但运用融合基因的办法似乎可以解决这一问题; 二是如何保持蝎毒素的活性。蝎毒素前体要经过翻译后加工才能成为有活性的毒素。所以只有能够提供翻译后正确加工能力的表达系统才有可能得到有生物活性的毒素蛋白。

参 考 文 献

- 1 熊玉梅, 凌敏华, 赵 彤, 等 (Xiong Y M, Ling M H, Zhao T, *et al.*). 两个东亚钳蝎抗哺乳动物神经毒素的 cDNA 序列. 生物化学与生物物理学报 (Acta Biochimica Biophysica Sinica), 1997, **29** (2): 200~ 205
- 2 Bouhaoual-Zahar B, Ducancel F, Zenouaki I, *et al.* A recombinant insect-specific alpha-toxin of *Buthus occitanus tunetanus* scorpion confers protection against homologous mammal toxins. Eur J Biochem, 1996, **238** (3): 653~ 660
- 3 Becerril B, Marangoni S, Possani L D. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tityus*. Toxicon, 1997, **35** (6): 821~ 835
- 4 Becerril B, Corona M, Garcia C, *et al.* Cloning of genes encoding scorpion toxins: an interpretative review. Toxicon, 1995, **14** (3): 339~ 357
- 5 Bougis P E, Rochat H, Smith L A. Precursors of *Androctonus australis* scorpion neurotoxins: structure of precursors, processing outcomes, and expression of a functional recombinant toxin II. J Biological Chem, 1989, **264** (32): 19259~ 19265
- 6 朱新生, 张庭芳, 朱玉贤 (Zhu X S, Zhang T F, Zhu Y X). 两个东亚钳蝎抑制型昆虫毒素 cDNA 的克隆及序列分析. 科学通报 (Chinese Science Bulletin), 1996, **41** (20): 1882~ 1886
- 7 Zilberberg N, Gurevitz M. Rapid isolation of full length cDNA clones by "inverse PCR": purification of a scorpion cDNA family encoding alpha neurotoxins. Anal Biochem, 1993, **209** (1): 203~ 205
- 8 Laraba-Djebari F, Legros C, Crest M, *et al.* The kalitoxin family enlarged: purification, characterization, and precursor nucleotide sequence of KTX sub (2) from *Androctonus australis* venom. J Biological Chem, 1994, **269** (52): 32835~ 32843
- 9 Corona M, Zurita M, Possani L D, *et al.* Cloning and characterization of the genomic region encoding toxin IV-5 from the scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. Toxicon, 1996, **34** (2): 251~ 256
- 10 Becerril B, Corona M, Coronas F I V, *et al.* Toxic peptides and genes encoding toxin gamma of the Brazilian scorpions *Tityus bahiensis* and *Tityus stigmurus*. Biochem J, 1996, **313** (3): 753~ 760
- 11 Delabre M L, Pasero P, Marilley M, *et al.* Promoter structure and intron-exon organization of a scorpion alpha-toxin gene. Biochemistry, 1995, **34** (20): 6729~ 6736
- 12 Gurevitz M, Urbach D, Zlotkin E, *et al.* Nucleotide sequence and structure analysis of a cDNA encoding an alpha insect toxin from the scorpion *Leiurus quinquestriatus hebraeus*. Toxicon, 1991, **29** (10): 1270~ 1272
- 13 Martir Eaucleaire M F, Ceard B, Ribeiro A M, *et al.* Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of a cDNA encoding the main β -neurotoxin from the venom of the South American scorpion *Tityus serrulatus*. FEBS, 1992, **302** (3): 220~ 222
- 14 Vazquez A, Tapia J V, Eliason W K, *et al.* Cloning and characterization of the cDNAs encoding Na super (+) channel-specific toxins 1 and 2 of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. Toxicon, 1995, **33** (9): 1161~ 1170
- 15 Becerril B, Vazquez A, Garcia C, *et al.* Cloning and characterization of cDNAs that code for Na super (+) -channel blocking toxins of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. Gene, 1993, **128** (2): 165~ 171
- 16 Becerril B, Corona M, Mejia M C, *et al.* The genomic region encoding toxin gamma from the scorpion *Tityus serrulatus* contains an intron. FEBS Lett, 1993, **335** (1): 6~ 8
- 17 Xiong Y-M, Ling M-H, Wang D-C, *et al.* The cDNA and genomic DNA sequences of a mammalian neurotoxin from the scorpion *Buthus martensii* Karsch. Toxicon, 1997, **35** (7): 1025~ 1031
- 18 Dee A, Belagaje R M, Ward K, *et al.* Expression and secretion of a functional scorpion insecticidal toxin in cultured mouse cells. Bio Technology, 1990, **8** (4): 339~ 342
- 19 Zilberberg N, Gordon D, Pelhate M, *et al.* Functional expression and genetic alteration of an alpha scorpion neurotoxin. Biochemistry, 1996, **35**: 10215~ 10222
- 20 Cory J S, Hirst M L, Williams T, *et al.* Field trial of a genetically improved baculovirus insecticide. Nature, 1994, **370**: 138~ 140
- 21 Pang S-Z, Oberhaus S M, Rasmussen J L, *et al.* Expression of a gene encoding a scorpion insectotoxin peptide in yeast, bacteria and plants. Gene, 1992, **116**: 165~ 172
- 22 Martir Eaucleaire M F, Sogaard M, Ramos C, *et al.* Production of active, insect-specific scorpion neurotoxin in yeast. Eur J Biochem, 1994, **223** (2): 637~ 645
- 23 Higgs S, Olson K E, Klimowski L, *et al.* Mosquito sensitivity to a scorpion neurotoxin expressed using an infectious Sindbis virus vector. Insect Mol Biol, 1995, **4** (2): 97~ 103
- 24 Chejanovsky N, Zilberberg N, Rivkin H, *et al.* Functional expression of an alpha ant insect scorpion neurotoxin in insect cells and lepidopterous larvae. FEBS Lett, 1995, **376** (3): 181~ 184
- 25 Luo M-J, Xiong Y-M, Wang M, *et al.* Purification and sequence determination of a new neutral mammalian neurotoxin from the scorpion *Buthus martensii* Karsch. Toxicon, 1997, **35** (5): 723~ 731

Advances in Molecular Biology of Scorpion Toxin Genes. ZHU Shun-Yi, LI Wen-Xin (*Institute of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China*).

Abstract The following studies on molecular biology of scorpion toxin genes were reviewed: (1) Strategies of cloning cDNAs or genomic genes encoding scorpion toxins; (2) scorpion toxin cDNAs and post-protein processing of precursor toxins; (3) Structural organization and pre-mRNA processing of genomic genes encoding scorpion toxins; (4) Expression of recombinant scorpion toxin genes in cells or organisms.

Key words scorpion toxin, cDNA, gene cloning, molecular biology