

日本鬼鲉毒腺 cDNA 表达文库的构建和初步分析*

姜孝玉 涂洪斌 陈慧萍 卫剑文 杨文利 吴文言 徐安龙**

(中山大学生命科学学院, 国家高新技术计划海洋生物功能基因组开放实验室, 广州 510275)

摘要 以海洋生物日本鬼鲉毒腺为材料, 应用 SMARTTM cDNA Library Construction 技术, 构建以真核表达载体 pcDNA3.0 为基础的日本鬼鲉毒腺 cDNA 表达文库. 通过对文库克隆的序列测定和初步生物信息学分析, 获得 94 个日本鬼鲉毒腺新表达序列标签 (ESTs), 其中已确定全长 cDNA 的克隆有 35 个, 包括溶细胞素基因、类短链神经毒素蛋白、C 型凝集素、巨噬细胞迁移抑制因子、致病相关基因等, 这些基因在日本鬼鲉中绝大多数为首次发现. 日本鬼鲉毒腺 cDNA 表达文库的成功构建, 为深入研究日本鬼鲉毒腺的组分及其分子作用机理奠定了基础.

关键词 日本鬼鲉, 毒腺, cDNA 表达文库

学科分类号 Q78

我国地处温带和亚热带, 刺毒鱼类相当丰富, 估计我国的刺毒鱼类有 100 多种, 其中以海洋鱼类为主, 鲉类为刺毒鱼类最大类群, 我国约 40 种^[1], 栖于浅海、海湾、沙岸、岩礁、珊瑚礁和海藻丛中, 行动缓慢, 体态与环境相似, 不易被发觉. 日本鬼鲉 (*Inimicus japonicus*) 属于毒鲉科 (Synanceiidae), 广泛分布于我国南海、东海、黄海和渤海. 其背鳍棘含较发达的毒腺组织, 毒性强, 被其毒棘刺伤可产生急性剧烈疼痛, 创口青紫、红肿、灼热, 痛状有如烧灼和鞭抽感, 难以忍受, 并伴有恶心、呕吐、心慌、胸闷等全身症状^[2-4]. 鲉类毒液主要包括多肽、蛋白质、多种酶类等, 鲉类的蛋白毒素主要作用于心血管系统, 引起血压降低、呼吸加速、心肌缺血、呼吸停止, 鲉类的蛋白毒素还能麻痹骨骼肌、平滑肌和心肌, 可引起死亡^[2,4]. 目前, 其作用的确切生物活性成分及相关的毒理和分子生物学作用机制仍不清楚. 本研究首次成功构建了日本鬼鲉 cDNA 表达文库, 为从分子水平研究鲉类毒液的组分和作用机理奠定了基础, 同时对毒素成分的进一步研究, 有望获得某些具有心血管和肌肉松弛效应的药物. 本文旨在利用基因组学的方法研究潜在药用海洋生物组织的有效组分并对其功能基因进行初步分析, 为深入研究药用功能基因奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 组织样品: 日本鬼鲉 (*Inimicus japonicus*) 采自广东省湛江市海域.

1.1.2 质粒和菌种: 哺乳动物细胞表达质粒 pcDNA3.0 购自 Invitrogen 公司; 宿主菌 *E. coli* DH5 α 为本实验室保存.

1.1.3 试剂和酶: 质粒提取和胶回收试剂盒为 OMEGA 公司产品. SMARTTM cDNA Library Construction Kit 为 CLONTECH 公司产品. 焦碳酸二乙酯 (DEPC)、MOPS、氨卞青霉素钠盐购自上海 Sangon 公司, TaqDNA 聚合酶为本实验室制备, 各种限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司. DNA 分子质量标准购自 Promega 公司. RNA marker 购自 Gibco 公司. 其他产品为国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 日本鬼鲉毒腺的处理: 剥离 5 条活的日本鬼鲉背鳍棘毒腺组织, 迅速加入适量的异硫氰酸胍变性液 (4 mol/L 异硫氰酸胍; 25 mmol/L 柠檬酸钠, pH 7.0; 0.5% 十二烷基肌氨酸钠 (SLS); 0.1 mol/L β -巯基乙醇), 充分匀浆破碎细胞, 按 1 g 毒腺组织加 10 ml 变性液的比例补足变性液后, -80℃ 冰箱中保存以备提取总 RNA^[5].

1.2.2 载体质粒 pcDNA3.0-Sfi I 的制备: PEG 纯化法^[6] 提取 pcDNA3.0 质粒, 经限制性内切酶 *EcoRI* 和 *Not I* 充分酶切后, 进行琼脂糖凝胶电泳, 回收载体 DNA. 具体回收步骤按 Omega Biotek 公司的 Gel Extraction Kit 说明书操作.

* 国家高新技术海洋领域 863 项目 (819-06-06) 和国家自然科学基金重点项目 (69935020).

** 通讯联系人.

Tel: 020-84113656, E-mail: ls36@zsu.edu.cn

收稿日期: 2001-09-20, 接受日期: 2001-10-18

为引入 *Sfi*I 酶切位点, 以 λ TriPLEx 2 为模板, 用 SMART™ Kit 中的测序引物进行 PCR 扩增, PCR 产物经 *Eco*RI 和 *Not*I 酶切, 用 T4 DNA 连接酶与经 *Eco*RI 和 *Not*I 酶切的 pcDNA3.0 载体 DNA 连接, 构建成 pcDNA3.0-*Sfi*I 质粒. 提取质粒 pcDNA3.0-*Sfi*I, 用限制性内切酶 *Sfi*I 酶切后, 回收载体 pcDNA3.0-*Sfi*I DNA, 方法同上; 为了减少载体自连, 载体 DNA 应用 *Sfi*I 再酶切一次, 然后回收, 载体 DNA 以 50 mg/L 的浓度保存备用.

1.2.3 日本鬼鲉毒腺总 RNA 的提取: 按一步快速酚法^[6]抽提保存于变性液中的日本鬼鲉毒腺组织总 RNA.

1.2.4 日本鬼鲉毒腺 cDNA 的合成: 按 Clontech 公司 SMART™ cDNA Library Construction Kit 说明书的操作进行第一链 cDNA 合成, 用 LD PCR 法扩增 cDNA, 用 *Sfi*I 酶切消化后过柱回收 dscDNA.

1.2.5 日本鬼鲉毒腺 cDNA 文库的构建: 用 T4 DNA 连接酶连接上述分别经 *Sfi*I 酶切的 pcDNA3.0-*Sfi*I 载体和毒腺 dscDNA, 连接产物转化 DH5 α 高效感受态细胞. 将转化产物分为两部分, 一部分经半固体琼脂糖培养基扩增后^[6], 提取质粒, 作为 cDNA 表达文库总库保存于 25% 甘油中, -80℃ 冻存; 另一部分涂布平板, 4℃ 保存备用^[5].

1.2.6 序列测定: 随机挑选文库克隆, 按 Omega Biotek Plasmid Miniprep Kit 的方法提取质粒. 使用 ABI PRISM 377 DNA Analyzer (Applied Biosystems), 采用 T7 和 SP6 通用引物为测序引物, 进行正反向序列测定, 对 cDNA 片段超过 1 000 bp 的序列, 根据已测得的序列设计引物, 继续测定 cDNA. 测序工作由中山大学生命科学学院中心实验室完成.

1.2.7 序列分析: 分别使用 Blast n 和 Blast x 搜索 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 的核苷酸和蛋白质数据库, 进行序列的相似性分析^[7]. 匹配性的 *P* 值为 10^{-5} 或更小, 我们认为序列之间有较高的相似性, 否则认为序列的相似性很低, 即 “low hits”, 数据库中若没有与其匹配的序列称为 “no hits”.

2 结果与分析

2.1 日本鬼鲉毒腺总 RNA 的提取

采用异硫氰酸胍一步法提取的日本鬼鲉毒腺总 RNA^[5], 经 1% 的琼脂糖甲醛变性胶电泳检测, 可

见清晰的 28 S 和 18 S 两条 rRNA 条带, 在 0.5 kb 以上有均匀的 smear 分布, 表明提取的总 RNA 完整性良好^[8].

2.2 日本鬼鲉毒腺 cDNA 的合成

取总 RNA 约 1 μ g 直接进行逆转录合成第一链, 取第一链产物的 1/5 通过 LD PCR 法扩增富集 cDNA, 留取一半 cDNA 于 -80℃ 保存备用, 另一半 cDNA 经 *Sfi*I 酶切消化, 过柱回收较大分子质量的 cDNA, 最终得到 7 μ l dscDNA. LD PCR 产物电泳结果呈现从小到大均匀分布的 smear, 大小在 0.2~5.0 kb 范围内, 主要集中于 500 bp 以上, 且在 800 bp 处有亮带 (图 1). 表明所合成的 cDNA 编码蛋白分子质量较分散, 日本鬼鲉毒腺的成分多样和转录的 mRNA 较为复杂, 亮带可能为毒腺的高丰度蛋白.

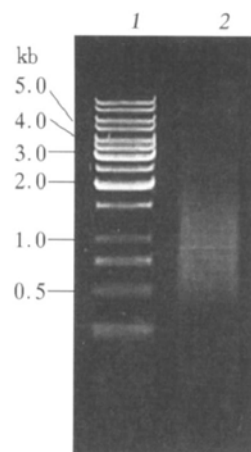


Fig. 1 The synthesized dscDNA on 2% agarose gel

1: 1 kb DNA ladder; 2: the synthesized dscDNA.

2.3 日本鬼鲉毒腺 cDNA 表达文库的构建和鉴定

取 1 μ l 双链 cDNA 用于连接反应, 反应体积 5 μ l, 转化其中 1 μ l 连接产物, 分别取 1/100、1/10 和 3/10 体积转化菌液涂板, 剩余菌液在半固体琼脂糖中扩增, 提取文库总质粒; 记数培养过夜平板的单菌落数分别为: 82、677 和 2 064 个. 因此双链 cDNA 7 μ l 可获得的 cDNA 表达文库克隆数为: $[(82 + 677 + 2\,064) \times (100/41)] \times 5 \times 7 = 2.4 \times 10^5$. 文库总质粒的酶切和 PCR 分析结果表明, 经 *Sfi*I 酶切的总库质粒呈现 0.1~5.0 kb 分布的 smear (图 2), 利用载体多克隆位点两端的 T7 和 SP6 引物 PCR 扩增的产物也出现类似分布 (图 2), 这与 cDNA 的大小相互吻合. 随机挑取 800 个克隆, 使用 T7 和 SP6 引物, 通过 PCR 扩增鉴定阳性克隆和估计插入 cDNA 片段的大小, 结果

显示大部分的插入片段在 500 bp 以上 (597/800), 部分重组子克隆的 PCR 结果见图 3. 通过载体自连片段的特异引物 PCR 扩增鉴定, 重组率超过 95% (在 800 个克隆中只有 11 个是自连).

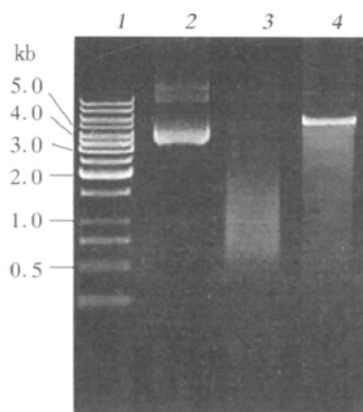


Fig. 2 Gel electrophoresis of total library plasmids, plasmids digested with *Sfi*I and PCR results from the total library plasmids with T7 and SP6 primers
1: 1 kb DNA ladder; 2: the total plasmids of library; 3: PCR results from the total library plasmids with T7 and SP6 primers; 4: the total plasmids of library digested with *Sfi*I.

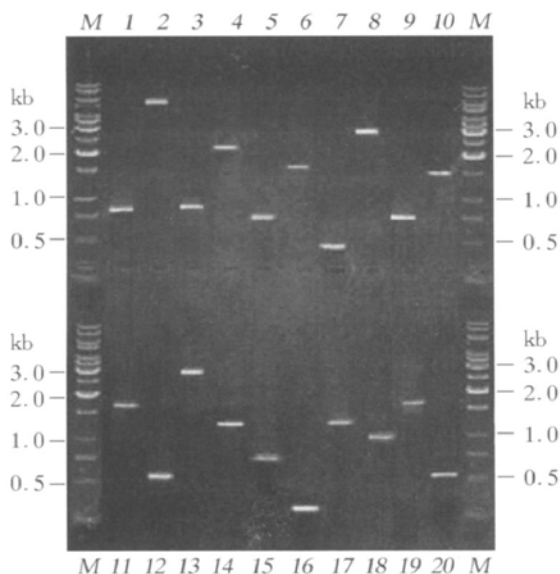


Fig. 3 Partial PCR results from clones in the library of *Inimicus japonicus* with T7 and SP6 primers
M: 1 kb DNA ladder; 1~20: PCR results from clones in the library of *Inimicus japonicus* with T7 and SP6 primers.

以上结果显示我们构建的日本鬼鲉毒腺 cDNA 表达文库在文库重组子数、重组率和插入片段大小等方面均符合良好文库的质量标准^[5,6].

2.4 日本鬼鲉毒腺 cDNA 的序列测定和分析

选取 cDNA 片段在 500 bp 以上的克隆, 随机测定了 150 个 cDNA 序列, 测序结果表明日本鬼鲉毒腺 cDNA 文库包含的基因多种多样, 这与日本鬼

鲉毒腺成分复杂多样相一致. 所得序列经 Blast x^[7] 初步分析表明, 已获得了 94 个日本鬼鲉毒腺新 EST 序列 (表 1), 其中已确定全长的 cDNA 克隆有 35 个, 包括结构蛋白基因, 代谢相关基因和多种毒素蛋白基因^[9~12]等 (表 2). 在日本鬼鲉毒腺中发现的这些基因多数为首次报道.

Table 1 Summary of *Inimicus japonicus*' venom EST data

EST category	No. of ESTs	Percentage
Total No. of ESTs	94	100
ESTs with significant match		
Ribosomal proteins	6	6.3
Metabolic enzymes	9	9.5
Toxin related proteins	13	13.8
Others	31	32.9
ESTs without significant match	35	37.2

3 讨 论

日本鬼鲉毒腺 cDNA 表达文库的成功构建, 为研究日本鬼鲉毒液的组分和药用分子作用机理奠定了基础. 刺毒鱼类毒液主要是蛋白毒, 含多种组分, 这些成分的分离纯化较复杂, 特别是那些理化性质非常接近的组分, 目前, 这些活性成分的纯化和结晶都存在一定的困难, 难以对各个成分进行深入的作用机理等方面的研究. 从研究开发药物的角度来看, 生化提取方法难以得到可以药用的单体, 对于药用的单体也因为不能得到氨基酸的全序列而无法成为新药进行报批. 另外, 生化提取需要消耗大量的海洋资源, 而有些资源不能重复收集, 同时, 亦不利于实施海洋生物资源可持续性开发利用的发展战略. 因此, 直接从基因入手不失为有效可行的方法.

日本鬼鲉毒腺 cDNA 表达文库的构建保存了基因资源, 在有利于野生资源保护的同时, 还可进一步利用功能筛选、分子杂交和 DNA 序列测定等现代分子生物学技术来寻找毒素或药用基因并进行基因工程生产. 除日本鬼鲉毒腺 cDNA 文库外, 我们实验室应用 SMARTTM cDNA Library Construction 技术构建了多个具有中药应用价值或具有毒腺的海洋生物的 cDNA 文库^[5]. 与其他 cDNA 文库构建方法比较, 本研究方法具有只需要微量的 RNA 样品, 可直接从总 RNA 出发合成 cDNA 及通过 LD PCR 方法富集全长 cDNA 片段等优点. 同时, 还可通过常规电泳对每一步骤进行实时监测. 因此特

别适合于珍贵稀少的中药材和海洋生物组织的 cDNA 文库的构建. 在 cDNA 过柱分离时, 可根据分子质量大小分管收集 cDNA; 选择分子质量大的 cDNA, 可以提高文库全长 cDNA 克隆比例, 减少筛选的工作量, 是一个文库构建的质量优化方法. 另外, 我们选用的文库载体可在真核细胞中表达, 能通过功能表达筛选的方法鉴定新基因的功能或直接从文库中筛选出具有特定功能的基因克隆.

经小规模随机测序, 我们获得了多个毒蛋白的全长 cDNA 克隆 (表 2), 发现了三种溶细胞素基因、一种短链神经毒素基因、C 型凝集素基因、巨噬细胞迁移抑制因子基因、肿瘤坏死因子基因、致病相关基因等^[10~12], 值得一提的是, 在日本鬼鲉毒腺 cDNA 文库所测的一百多个序列中, 有 6 个克隆的编码氨基酸序列与 C 型凝集素的序列相似. 推测 C 型凝集素是日本鬼鲉毒腺的一种高丰度蛋

Table 2 BLAST analysis of full-length cDNA clones from the cDNA library of *Inimicus japonicus*' venom

Clone	Putative identification	Accession No.
Ribosomal proteins		
JU 31	40S ribosomal protein S18	P25232
G38	Ribosomal protein L22	S52084
R28	40S ribosomal protein	P25111
JS66	60S ribosomal protein L6	P47911
R29	60S ribosomal protein L32-B	O42935
R40	60S ribosomal protein L10	P27635
Metabolic enzymes		
JS22	Nucleoside-diphosphate kinase	P19804
JS72	Hyaluronan synthase I	AB017803
R14	NADH-ubiquinoneoxidoreductase	Q02380
R26	Cytochrome c oxidase: subunit= I	2014204B
R9、G90	Cytochrome c oxidase chain II	T11537
Toxin related proteins		
G17、G11、R11	Equinatoxin II (cytolytic toxin)	P17723
JS85、JU33、G14、G29、R10、R34	C-type lectin	AB034807
R42、R18	Macrophage migration inhibitory factor	P80177
G30	Short neurotoxin	P80958
JU 19	Pathogenesis related protein 1	S10205
Others		
JS33	Osteonectin	U25721
JS81、JU 19	CG4270 gene product	AE003583
G106	Placental calcium-binding protein	P26447
G10	High mobility group like nuclear protein 2 homolog	P32495
G13	Hemoglobin beta 1/2 chain	P45720
R33	Hemoglobin alpha chain	P11748
G78	Metallothionein	AF199014
G80	Inducible cAMP early repressor	A49317
R21	Calcium channel gamma 5 subunit	AF142621

The complete cDNA sequence is the one that has a complete open reading frame (ORF) and covers whole sequence of the matched gene ($P \leq 10^{-5}$).

白, 这也与日本鬼鲉毒腺 ds cDNA 的电泳结果相符, 因为在 800 bp 处有一条亮带, 这一大小正好与凝集素的大小相符. 毒腺不是鱼的免疫器官, 而有表达丰度较高的凝集素存在, 暗示凝集素除了免疫功能外, 可能还有其他的作用. 研究表明^[10]:

从溶血性毒蛇的蛇毒中分离出了多种 C 型凝集素, 这类凝集素具有促淋巴细胞分裂, 血小板凝集和引起水肿等活性, 因此, 对日本鬼鲉毒腺基因的进一步研究有重大的理论和实践意义. 值得注意的是, 从文库中获得数个具有完整读码框 (ORFs) 的基

因序列, 同源序列分析结果为“low hits”或“no hits”, 表明这些基因在 GenBank 中几乎没有同源序列, 是全新基因, 这意味着他们很可能具有某种新颖的特殊功能. 为了更准确把握基因资源, 大规模的测序工作和功能筛选正在进行, 我们相信, 随着功能基因组研究数据的不断积累和生物信息学分析技术的完善, 必将促进对此类海洋生物特有的全新功能基因的研究, 从而有助于提高人们对海洋生物的认识, 甚至为某些生命科学基本问题的阐明提供线索和证据^[13, 14].

参 考 文 献

- 1 黄宗国. 中国海洋生物种类与分布. 北京: 海洋出版社, 1994. 737~ 739
Huang Z G. Marine Species and Their Distributions in China's Seas. Beijing: China Ocean Press, 1994. 737~ 739
- 2 霍尔斯特德 B W. 世界海洋毒鱼. 北京: 科学出版社, 1984. 204~ 220
Halstead B W. Poisonous and Venomous Marine Animals of the World. Beijing: Science Press, 1984. 204~ 220
- 3 伍汉霖, 金鑫波, 倪 勇. 中国有毒鱼类和药用鱼类. 上海: 上海科学技术出版社, 1978. 190~ 191
Wu H L, Jin X B, Ni Y. Ichthyotoxic Fishes and Fish Drugs of China. Shanghai: Shanghai Science Technology Press, 1978. 190~ 191
- 4 宋杰军, 毛庆武. 海洋生物毒素学. 北京: 北京科学技术出版社, 1996. 445~ 450
Song J J, Mao Q W. Marine Biototoxicology. Beijing: Beijing Science Technology Press, 1996. 445~ 450
- 5 钟肖芬, 卫剑文, 赵贵军, 等. 平鲐海蛇毒腺 cDNA 表达文库的构建. 中山大学学报, 2001, 40 (3): 66~ 69
Zhong X F, Wei J W, Zhao G J, *et al.* Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2001, 40 (3): 66~ 69
- 6 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 345~ 356
- 7 Altschul S F, Madden T L, Schaffer A A. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research, 1997, 25 (17): 3389 ~ 3402
- 8 Lehrach H, Diamond D, Wozney J M, *et al.* RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. Biochemistry, 1977, 16 (21): 4743
- 9 Yumiko K, Toshiaki N, Tomoaki T, *et al.* Primary structure and biological activity of snake venom lectin (APL) from *Agkistrodon P. piscivorus* (Eastern cottonmouth). Toxicon, 1999, 37 (7): 1053~ 1064
- 10 Seamas C D, Richard B. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of glucocorticoid activity with a critical role in inflammatory disease. Molecular Medicine Today, 1997, 3 (11): 502~ 507
- 11 Lee T H, Lee G W, Ziff E B, *et al.* Isolation and characterization of eight tumor necrosis factor-induced gene sequences from human fibroblasts. Molecular Cell Biology, 1990, 10 (5): 1982~ 1988
- 12 Frédéric A M, Robert F, Evelyne B, *et al.* Ca²⁺ and Na⁺ contribute to the swelling of differentiated euroblastoma cells induced by equinatoxin II. Toxicon, 2000, 38 (11): 1547 ~ 1560
- 13 Kiew L W, Saw P C, Szu T N, *et al.* A survey of genes in *Eimeria tenella* merozoites by EST sequencing. International J Parasitology, 1999, 29 (12): 1885~ 1892
- 14 Davoli R, Zambonelli P, Bigi D, *et al.* Analysis of expressed sequence tags of porcine skeletal muscle. Gene, 1999, 233 (2): 181~ 188

The Construction of cDNA Expression Library from the Venom of *Inimicus japonicus**

JIANG Xiao-Yu, TU Hong-Bin, CHEN Hui-Ping, WEI Jian-Wen,
YANG Wen-Li, WU Wen-Yan, XU An-Long**

(The Open Laboratory for Marine Functional Genomics National High-Tech Department, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract A cDNA library of the venom of *Inimicus japonicus* was constructed. The cDNA was cloned into eukaryotical expression plasmid pcDNA3.0. SMARTTM protocol was used for cDNA library construction and bioinformatics analysis was carried out. 94 novel EST clones were obtained from 150 sequences in the library, of which there were 35 full-length clones, including cytolysin genes, short neurotoxin gene, C-type lectin gene, macrophage migration inhibitory factor gene and so on. Most of those genes were reported for the first time in *Inimicus japonicus*. Further studies on those genes and large scales of sequencing in the library are going on, which may be helpful to make clear the components of *Inimicus japonicus* venom and understand the function of those proteins at molecular level.

Key words *Inimicus japonicus*, venom, cDNA expression library

* This work was supported by grants from the State 863 High Technology Project of China (819-06-06) and the National Natural Sciences Foundation Key Project of China (69935020).

** Corresponding author. Tel: 86-20-84113655, E-mail: ls36@zsu.edu.cn

Received: September 20, 2001 Accepted: October 18, 2001