

平颞海蛇 CRVP 基因全长 cDNA 片段的克隆和序列分析*

卫剑文, 钟肖芬, 彭立胜, 吴文言, 徐安龙

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

摘 要:通过对平颞海蛇毒腺 cDNA 文库的随机测序和 PCR 筛选, 克隆得到两种分别长为 1 309 和 1 307 bp 的编码半胱氨酸丰富毒蛋白 (cysteine-rich venom protein, CRVP) 的全长 cDNA 序列. 这两种 *crvp* 基因同源性为 97%, 分别编码 238 和 199 个氨基酸残基, 其中包括一段相同的由 19 个氨基酸残基组成的信号肽. 氨基酸序列分析表明, 这两种 CRVP 蛋白与蜥蜴 *helothermine* 毒素蛋白以及台湾饭铲倩 CRVP 毒蛋白高度同源, 而且具有半胱氨酸丰富分泌蛋白 (cysteine-rich secretory protein, CRISP) 家族的典型结构特征.

关键词:平颞海蛇; 半胱氨酸丰富毒蛋白 (CRVP)

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2001) 04-0005-04

蛇毒富含酶、毒性蛋白和活性肽等多种活性物质, 长期以来都是理论研究和药物开发的热点^[1]. 然而由于天然蛇毒的产量很低, 严重限制了对蛇毒的研究和开发. 随着基因工程技术的不断发展, 利用重组 DNA 技术大量表达重组蛇毒活性蛋白已经成为解决这一问题的有效途径. 为了进行重组表达, 首先要得到编码活性蛋白的 cDNA 序列. 这方面的工作在陆地蛇上已广泛开展, 多种陆地毒蛇的蛇毒蛋白 cDNA 序列包括神经毒素、心脏毒素、细胞毒素、磷脂酶 A2、纤维蛋白酶、金属蛋白酶等先后被克隆^[2]. 而对海蛇的研究则相对落后得多, 目前只有少数几种海蛇的神经毒素、磷脂酶 A2 的 cDNA 序列有文献报道^[3~5]. 本研究通过对平颞海蛇毒腺 cDNA 文库克隆的测序和 PCR 筛选, 首次克隆得到了两种编码半胱氨酸丰富毒蛋白 (cysteine-rich venom protein, CRVP) 的全长 cDNA 序列, 为下一步进行重组表达以及结构与功能的研究奠定了基础.

1 材料和方法

1.1 材 料

1.1.1 平颞海蛇 (*Hydrophiinae*, *Lapemis hardwickii* Gray) 采自广西省北海市.

1.1.2 质粒和菌株 质粒载体 pcDNA3 购自 Invitrogen 公司; 大肠杆菌受体菌 DH5 α 为本实验室

保存.

1.1.3 试剂盒 mRNA Purification Kit、Time-SaverTM cDNA Synthesis Kit 和 Directional Cloning Toolbox 均为 Amersham Pharmacia 公司产品.

1.2 方 法

1.2.1 cDNA 的合成及文库构建 平颞海蛇毒囊总 RNA 的提取参考文 [6] 的一步快速热酚抽提法进行; mRNA 的提取按 mRNA Purification Kit 说明书操作; 按 TimeSaverTM cDNA Synthesis Kit 和 Directional Cloning Toolbox 说明书操作.

1.2.2 克隆序列测定 PEG 纯化法^[6]提取质粒 DNA. 以 T7 和 SP6 为测序引物, 采用 ABI377 DNA Sequencer DNA 自动序列仪, 由大连宝生物工程公司完成.

1.2.3 PCR 筛选 PCR 扩增、基因克隆按常规方法进行^[6].

1.2.4 序列分析和同源检索 应用 DNATOOLS 5.1 软件进行.

2 结果与讨论

2.1 平颞海蛇毒腺 cDNA 文库的构建和 CRVP 毒蛋白 cDNA 克隆的 PCR 筛选

所构建的平颞海蛇毒腺 cDNA 文库的克隆数为 9.96×10^5 , 重组率大于 95%, 具有较高的质量^[7]. 随机挑选 20 个克隆进行序列测定, 所得

* 基金项目: 国家高新技术海洋领域 863 资助项目 (819-06-06)

收稿日期: 2000-09-01; 作者简介: 卫剑文 (1973-), 男, 讲师; 通讯联系人: 徐安龙.

核苷酸序列通过 Blast 分析, 结果表明 274 号克隆 cDNA 序列 (623 bp) 与 Chang 等^[2]报道的台湾饭铲倩 (Taiwan Habu) CRVP 毒蛋白 cDNA 3' 端具有较高的同源性。

根据 pcDNA3 质粒载体克隆位点序列以及 274 号克隆 3' 端的序列设计引物以扩增全长的 *crvp* 基因。上游引物为 T7 promoter primer: 5' TAA TAC GAC TCA CTA TA 3'; 下游引物为 *crvp*-primer: 5' GTT TCC CTT TGG CAT TCA TAA G 3'。对近 500 个克隆进行了 PCR 筛选, 结果得到了 4 个扩增片段约为 1kb 的阳性克隆, 编号分别为 7, 350, 475, 486。

2.2 平颊海蛇 CRVP 毒蛋白 cDNA 的核苷酸序列测定和分析

测序结果表明上述 4 个克隆所含序列有两种: 7, 350 和 486 号克隆的序列是相同的, 命名为 *crvp7*; 274 与 475 则是另一种, 命名为 *crvp475*, 两个基因长分别为 1 309 和 1 307 bp, 同源性为 97%。核苷酸序列分析显示 (图 1), *crvp475* 和 *crvp7* 都具有完整的阅读框架, 分别编码 238 和 199 个氨基酸残基。它们的 3' 非翻译区都长达约 560 bp, 在 poly A 序列上游有两个邻近的加尾信号序列 AATAAA (见图 1 序列中的下划线部分)。



图 1 平颊海蛇 CRVP 毒蛋白 cDNA 的核苷酸序列和推算的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of CRVP cDNA

顶上两行分别为 475 号和 7 号的核苷酸序列, 它们相同的碱基用“-”代替。方框部分为 *crvp*-primer, 下划线部分为 poly A 加尾信号序列 AATAAA; 斜体部分为推算的氨基酸序列, 两者差异之处用“/”分隔。氨基酸序列中阴影部分为 19 个氨基酸残基的信号肽。

2.3 平颊海蛇 CRVP 毒蛋白氨基酸序列分析

crvp475 和 *crvp7* 编码的氨基酸序列同源性极高, 主要差异在于 *crvp7* 在 634~695 bp 处出现多个碱基的改变从而使阅读框架提前终止, 初步认为这两种基因是海蛇在进化过程中发生点突变而形成的 *crvp* 异构基因。通过 SignalP V1.1 World Wide Web Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), 对 *crvp475* 和 *crvp7* 编码的氨基

酸序列进行分析, 结果推算出平颊海蛇 CRVP 毒蛋白在 N 端有一段相同的长 19 个残基的信号肽 (见图 1 箭头线所示)。Blast 同源检索分析表明, 平颊海蛇 CRVP 毒蛋白 (下文均以 *crvp475* 的编码序列为目标序列) 与台湾饭铲倩 CRVP 毒蛋白 (CRVP-TRIMU)、马精液的半胱氨酸丰富分泌蛋白-3 (CRS3-HORSE)、人的睾丸特异蛋白 (testis specific protein, TPX1-HUMAN)、墨西哥毒蜥蜴的

helothermine 毒素蛋白 (HELO) 和老鼠的酸性附睾糖蛋白 (acidic epididymal glycoprotein, AEG-RAT) 具有较高的同源性, 最大同源性依次为 71%, 67%, 67%, 64%, 62%。这些蛋白都属于半胱氨酸丰富分泌蛋白 (cysteine-rich secretory protein, CRISP) 家族^[2]。由这五种蛋白序列的多序列比较结果可以看出, CRVP475 存在着与 CRISP 蛋白家族高度保守的 16 个半胱氨酸残基 (图 2 中序列阴影部分), 表明它们具有相同的二硫键结构。同时, 通过 PIR Pattern Match (<http://www-nbrf.georgetown.edu/pirwww/search/patmatch.html>) 对 PROSITE database 的搜索结果表明, CRVP475 的氨基酸序列中存在 Extracellular proteins SCP/Tpx-1/Ag5/PR-1/Sc7 signature 1 和 2, 位置分别是 133 ~ 143

(GHYTIQIVWYKS) 和 159 ~ 170 (LYVCQYCPAG-NI)。这两个信号序列是 CRISP 蛋白家族的典型结构, 据此我们认为, 平颞海蛇 CRVP 应该属于 CRISP 蛋白家族。

平颞海蛇 CRVP 毒蛋白的功能还不是很清楚。Morrisette 等^[9]的研究表明, helothermine 具有阻断心脏和骨骼肌质网状组织的 ryanodine 受体以及 Ca^{2+} 释放的功能。由图 2 可见, 在序列上 CRVP475 与墨西哥毒蜥蜴的 helothermine 毒素蛋白有着很高的同源性, 大多数的氨基酸序列是相同的或为性质相近的氨基酸所代替。CRVP 475 与 HELO 的高度相似性, 使我们推测平颞海蛇 CRVP 可能也具有类似 helothermine 的功能。平颞海蛇 CRVP 进一步的重组表达和功能分析正在进行之中。



图2 CRVP 毒蛋白、helothermine 与哺乳类动物 CRISP 蛋白家族的氨基酸序列比较

Fig.2 Multiple alignment and sequence comparison of the CRVP, helothermine and mammalian CRISP family proteins

* 代表完全相同的氨基酸, ; 表示氨基酸性质很相似, . 表示氨基酸性质较相似, 空格表示氨基酸性质完全不同; CRVP475-HELO 为平颞海蛇 CRVP475 与墨西哥毒蜥蜴 helothermine 之间的一致序列。序列阴影部分为保守的 16 个半胱氨酸残基; 序列方框部分先后分别为 Extracellular proteins SCP/Tpx-1/Ag5/PR-1/Sc7 signature 1 和 2。

参考文献:

- [1] 覃公平. 中国毒蛇学[M]. 第2版. 南宁: 广西科学技术出版社, 1998.
- [2] CHANG T Y, MAO S H, GUO Y W. Cloning and expression of a cysteine-rich venom protein from *Trimeresurus mucrosquamatus* (Taiwan habu) [J]. *Toxicon*, 1997, 35(8): 879–888.
- [3] TORU T, SATOSHI O, EISAKU N, et al. Complete nucleotide sequences of cDNAs encoding long chain α -neurotoxins from sea krait, *Laticauda semifasciata* [J]. *Toxicon*, 1999, 37: 181–185.
- [4] DUCANEL F, GUIGNERY-FRELAT G, et al. Sequence analysis of a cDNA encoding a PLA2 from the sea-snake *Aipysurus laevis* [J]. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16(18): 9048.
- [5] FUSE N, TSUCHIYA T, et al. Structure of the snake short-chain neurotoxin, erabutoxin c, precursor gene [J]. *Eur J Biochem*, 1990, 193(3): 629–633.
- [6] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993.
- [7] 钟肖芬, 卫剑文, 赵贵军, 等. 平颞海蛇毒腺 cDNA 表达文库的构建 [J]. 中山大学学报(自然科学版), 2001, 40(3): 66–69.
- [8] CHIKAHISA T. The toxinology of sea snake venoms [J]. *J Toxicol-toxin Rev*, 1998, 17(3): 361–372.
- [9] MORRISSETTE J, et al. Primary structure and properties of helothermine, a peptide toxin that blocks ryanodine receptors [J]. *Biophys J*, 1995, 68: 2280–2288.

Cloning and Sequence Analysis of Full – Length cDNA Encoding Cysteine – Rich Venom Protein from *Lapemis hardwickii*

WEI Jian-wen, ZHONG Xiao-fen, PENG Li-sheng, WU Wen-yan, XU An-long
(The National Opening Laboratory for Marine Functional Genomics Research,
Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Two full-length cDNA, 1 309 and 1 307 bp in length, for cysteine-rich venom protein (CRVP) were constructed by sequencing and PCR Screening of cDNA clones from a cDNA library of venom gland of *Lapemis hardwickii*. The sequence identity of two cDNAs was 97%. The predicted CRVP consisted of 238 and 199 amino acid residues including a putative signal peptide of 19 residue, and they were highly homologous to a lizard helothermine and a Taiwan Habu CRVP. Amino acid sequence analysis suggested that the CRVP had the specific sequence structure, which was conserved in cysteine – rich secretory protein (CRISP) family.

Keywords: *Lapemis hardwickii*; cysteine-rich venom protein