

平颞海蛇毒腺 cDNA 表达文库的构建^{*}

钟肖芬, 卫剑文, 赵贵军, 吴文言, 徐安龙
(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 以真核表达载体质粒 pcDNA3 为载体, 成功构建了一个高质量的平颞海蛇毒腺 cDNA 表达文库, 这是国内首个海蛇 cDNA 文库. 通过对亚文库克隆的大规模序列测定和分析, 发现了 38 个海蛇新基因序列, 其中包括神经毒素基因、磷脂酶 A₂ 基因和半胱氨酸丰富毒蛋白基因共 10 个编码海蛇毒素蛋白的新基因.

关键词: 平颞海蛇; 毒腺; cDNA 表达文库

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2001) 03-0066-04

世界上现有海蛇约 90 种, 均为毒蛇, 东南亚海域的海蛇有 9 属 15 种, 主要集中于南中国海, 较常见的有 7 种, 其中, 青环海蛇 (*Hydrophis cyanocinctus*) 和平颞海蛇 (*Lapemis hardwickii*) 是南海海域优势蛇种^[1].

海蛇毒素中含有 20 种以上的活性成分, 迄今已知的都是蛋白质或多肽, 包括酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、亮氨酸胺酶、5'核苷酸酶、磷脂酶 A、乙酰胆碱酯酶、长链和短链神经毒素等等, 且大多数属于低分子量蛋白质^[2]. 海蛇毒素的毒性要比陆地蛇强得多^[2], 具有多种多样的毒理和药理效应, 在治疗肿瘤、心血管以及神经系统疾病等方面有一定的作用^[3,4]. 海蛇药用始载于中国唐代药书《本草拾遗》, 迄今已成为人类寻找新药的源泉和进行生命科学研究的重要参考工具, 借助现代生物化学、分子生物学、生理学和药理学等方法来研究海蛇的有效成分, 进一步对活性蛋白进行基因工程重组表达, 有着重要的经济和学术价值.

平颞海蛇毒腺 cDNA 表达文库的构建为从分子水平研究海蛇毒素奠定了基础, 结合功能筛选、基因重组表达等方法, 可以在基因序列与蛋白功能之间架起一座桥梁, 解决了传统生化提取方法无法避免的产量低, 成本高, 纯度低^[5]等问题, 加快了从海蛇中筛选创新药物的步伐. 同时, 也将为我国海洋生物肽类物质的研究探索一条新路.

1 材料和方法

1.1 材 料

1.1.1 组织样品 四条平颞海蛇 (*Hydrophiinae*, *Lapemis hardwickii* Gray) 采自广西省北海市.

1.1.2 宿主菌和质粒载体 哺乳动物细胞高效表达载体质粒 pcDNA3, 购自 Invitrogen 公司. 宿主菌 DH5 α 为本实验室保存.

1.1.3 试剂和酶 mRNA Purification Kit、Time-SaverTM cDNA Synthesis Kit 和 Directional Cloning Toolbox 均为 Amersham Pharmacia 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 聚合酶为本实验室保存, 各种限制性内切酶和 T₄ DNA Ligase 购自 NEB 公司, 其它产品为国产分析纯.

1.2 方 法

1.2.1 平颞海蛇毒腺组织的处理 将活的平颞海蛇断头处死, 分离出完整毒腺, 液氮中充分研磨, 待液氮挥发完全后, 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; w=0.5% SLS; 0.1 mol/L β -巯基乙醇), -80 °C 冰箱中保存以备提取总 RNA.

1.2.2 载体质粒的构建 采用 PEG 纯化法^[6] 提取质粒 pcDNA3, 经限制性内切酶 *Eco*RI 和 *Not*I 作用后, 进行琼脂糖电泳, DNA 回收按 QIA-GEN 公司的 GEL EXTRACTION KIT 说明书操作. 回收后的载体 DNA 重复上述酶切和回收步骤, 以 50 ng/ μ L 的质量浓度保存.

* 基金项目: 国家高技术 (863) 计划资助项目 (819-06-03)

收稿日期: 2000-09-01; 作者简介: 钟肖芬 (1973—), 女, 博士研究生, 通讯联系人: 徐安龙.

1.2.3 平颞海蛇毒囊总 RNA 的提取 将含平颞海蛇毒腺组织的变性液离心后取上清，参考文献 [7] 的一步快速热酚抽提法进行总 RNA 的提取，稍作修改。

1.2.4 平颞海蛇毒腺 mRNA 的提取 按 Amersham Pharmacia 公司的 mRNA Purification Kit 说明书进行操作。

1.2.5 平颞海蛇毒腺 cDNA 的合成 按 Amersham Pharmacia 公司的 TimeSaver™ cDNA Synthesis Kit 说明书进行操作。因为表达文库对插入片段有方向要求，故采用 Amersham Pharmacia 公司的 Directional Cloning Toolbox 中含限制性内切酶 NotI 位点的 oligo dT primer 代替原试剂盒中的 cDNA 第一链合成引物。

1.2.6 平颞海蛇毒腺 cDNA 文库的构建 对双链 cDNA 的两端进行如下加工：5'端连接上 EcoRI 接头，3'端用 NotI 酶消化产生粘性末端。将加工后的 cDNA 定向连接到 pCDNA3 的 EcoRI 和 NotI 酶切窗口上，转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞，转化和感受态制备方法见文献 [8]。将转化产物分成两部分，一部分经过扩增后，保存于 $\varphi=25\%$ 甘油中，得到 cDNA 表达文库总库，冻存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。另外一部分等分为 100 个亚文库，经分别扩大培养后， $\varphi=25\%$ 甘油保存，用于下一步的序列测定和功能筛选。

1.2.7 序列测定 随机挑选亚文库克隆，PEG 纯化法提取质粒 DNA。以 T7 和 SP6 为测序引物，采用 ABI377 DNA Sequencer DNA 自动序列仪（由大连宝生物工程有限公司提供），正反向进行序列测定。

2 结果与分析

2.1 平颞海蛇毒腺总 RNA 的提取

采用异硫氰酸胍一步法提取的平颞海蛇毒腺总 RNA 经 $\varphi=1\%$ 甲醛变性胶电泳检测可见清晰的 28S、18S 和 5.8S 三条 rRNA 条带，和数条特异 RNA 条带（图 1，第 3 道），表明总 RNA 完整性良好，而且表现出平颞海蛇毒腺的高分化特点。

2.2 平颞海蛇毒腺 mRNA 的提取

所得平颞海蛇毒腺 polyA⁺ mRNA 进行 $\varphi=1\%$ 甲醛变性胶电泳，电泳结果呈现从大到小均匀的涂抹分布（图 1，第 2 道），表明 mRNA 的完整性良好，片段大小在 200 bp 以上，一般来

说，完整性良好的 mRNA 呈现为大约介于在 500 bp 到 8 kb 之间的一片拖影^[9]，但是根据蛇毒蛋白以较低相对分子质量为主的特点，所得 mRNA 片段大小在 200 bp 以上应属于正常现象。

实验经验表明，mRNA 的纯度对所构建的文库的质量起关键性的作用，而不应该只注重 mRNA 的得率，所以采用 2 次 oligo (dT) cellulose 分离 mRNA，可以提高 mRNA 的质量，为文库的成功构建打下良好的基础。

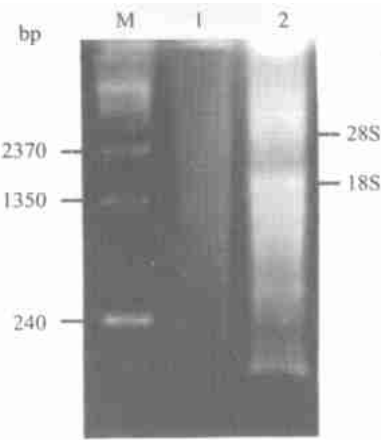


图 1 平颞海蛇毒腺总 RNA 和 polyA⁺ mRNA 的甲醛变性脑电泳分析

Fig 1 Denaturing agarose gel analysis of total RNA and polyA⁺ mRNA from the venom gland of *Laxemis hardwickii*

1 RNA 相对分子质量标准;
2 polyA⁺ mRNA; 3 总 RNA

2.3 cDNA 的合成

取约 5 μg mRNA 进行逆转录，合成双链 cDNA，得到总体积为 150 μL 的双链 cDNA。电泳结果显示 cDNA 呈现从大到小均匀的涂抹分布，在约 500 bp 处有一较亮的泳带（图 2），虽然 cDNA 的大小在 500 bp 到 8 kb 的范围内，但主要集中在 2 kb 以下的区域，表明我们合成的 cDNA 编码的蛋白的相对分子质量大部分较小，相对分子质量主要集中在 10 000 ~ 25 000 左右，甚至更小，这与蛇毒中富含小分子多肽的事实相吻合。同时也证明了用于文库构建的组织材料选择的正确性，有针对性的选择高丰度组织可以减少实验的困难程度和复杂程度。

2.4 平颞海蛇 cDNA 表达文库的构建和鉴定

取 5 μL cDNA（1/30 体积）进行连接反应，连接产物体积为 35 μL ，转化其中 5 μL （1/7 体积），取 1/10 体积涂板，得到 460 个单菌落，从

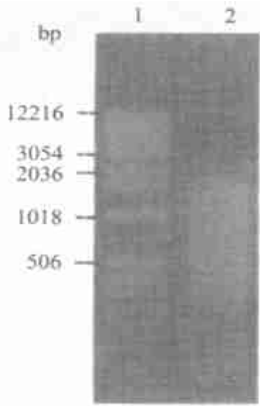


图 2 合成的平颞海蛇毒腺双链 cDNA w= 2%琼脂糖凝胶电泳分析
Fig 2 w= 2% agarose gel analysis of the synthesized cDNA

1 1000 bp DNA ladder 相对分子质量标准;
2 全成的平颞海蛇毒腺 cDNA

而可以计算出 $5\mu\text{L}$ cDNA 所得的 cDNA 表达文库克隆数为： $460\times 10\times 7=3.22\times 10^4$ 。提取整个文库的总质粒进行酶切和 PCR 分析，结果显示经 *Eco*RI 和 *Not*I 双酶切的总库质粒在 8 kb ~ 100 bp 区域出现从大到小均匀的涂抹分布（图 3，第 2 道），而且在 500 bp、1 kb 处出现较亮的泳带（在其它区域还存在数条弱带），用 pcDNA3 多克隆位点两端的 T7 和 T3 primer 进行 PCR 检测，电泳结果也出现与酶切类似的情况（图 3，第 1 道）。挑取 172 个单菌落提取质粒，通过酶切鉴定只有 3 个克隆为空载质粒，重组率超过 95%，其中对部分克隆进行的酶切鉴定结果见图 4，其余结果未列出。

美国克隆技术公司关于一个良好的基因文库的质量标准是：原始文库的重组子数大于 $5\times 10^5\sim 5\times 10^7$ ，重组率大于 90%，插入 cDNA 片段不小于 0.3 kb，平均插入片段大于 1 kb^[9]。根据实验结果和蛇毒蛋白组成特点，所构建的平颞海蛇毒腺 cDNA 表达文库质量较高。

实验经验表明，转化效率的高低与文库的质量也有直接的关系，在没有电击设备的条件下，感受态细胞的质量相当重要。另外，尽可能的减少所加入的连接产物的量能提高转化效率。

2.5 平颞海蛇毒腺 cDNA 的序列测定

随机测定了约 500 个克隆的 DNA 序列，测序结果表明平颞海蛇毒腺 cDNA 文库中毒素基因的丰度很高，迄今为止已发现了 38 个海蛇新基

因序列，包括 3 个短链神经毒素基因、2 个长链神经毒素基因，3 个磷酸脂酶 A₂ 基因和 2 个半胱氨酸丰富毒蛋白基因共 10 个海蛇毒素基因，其序列已在 GENBANK 登录。

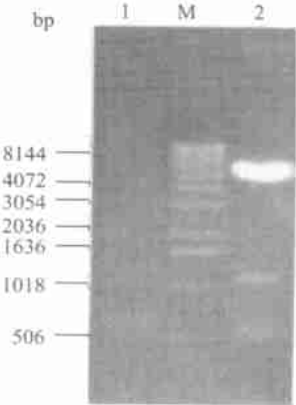


图 3 平颞海蛇毒腺 cDNA 质粒表达文库总质粒的酶切鉴定和 PCR 扩增结果

Fig 3 The restrict endonuclease pattern and PCR amplification of the plasmid which extract from the cDNA expressional library of the venom gland of *Lapenis hardwickii*

1 平颞海蛇毒腺 cDNA 文库总制粒粒的 *Eco*RI 和 *Not*I 的双酶切鉴定结果;
2 1000 bp DNA ladder 相对分子质量标准;
3 平颞海蛇毒腺 cDNA 文库总质粒的 PCR 扩增结果

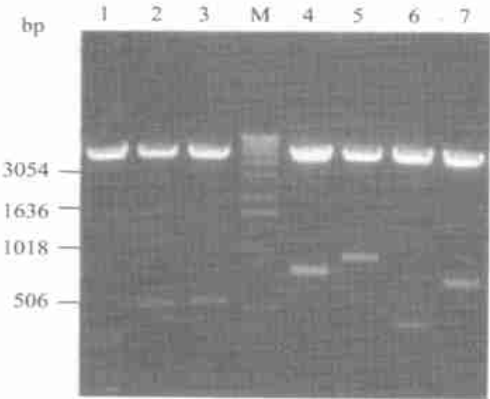


图 4 平颞海蛇毒腺 cDNA 质粒表达文库随机挑选的重组子的 *Eco*RI 和 *Not*I 酶切鉴定结果

Fig 4 The random recombinants digested by *Eco*RI and *Not*I , which come from the cDNA expressional library of the venom gland of *Lapenis hardwickii*

1~7 平颞海蛇毒腺 cDNA 文库重组子的 *Eco*RI 和 *Not*I 酶切鉴定结果;
M 1000 bp DNA ladder 相对分子质量标准

3 讨 论

海蛇毒含有 20 种以上的具有生物活性的成分，这些成分的分离纯化较复杂，特别是有些理化性质非常接近的成分，如海蛇含有多种性质相似的长神经毒素和短神经毒素^[10]，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研究。从药物的研究开发角度来看，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的可持续性开发利用的发展战略。

cDNA 不含内含子，可以直接用于基因工程生产。平颞海蛇 cDNA 表达文库的建立，在一次性永久保存基因资源的同时，可以利用功能筛选、免疫学筛选、Southern 杂交和大规模序列测定等现代分子生物学技术来寻找活性蛋白基因，采用基因工程技术进行生产。采用基因工程技术生产的蛇毒制剂具有产量大，纯度高的优点，并有利于野生资源的保护。

参考文献：

[1] 汤圣希, 黎肇炎, 舒雨燕, 等. 青环海蛇毒、平颞海蛇毒的毒理及抗海蛇毒血清的研制[J]. 中国蛇学杂志, 1995, 4(3): 21— 23.

[2] CHIKAHISA T. The toxinology of sea snake venom[J]. J Toxicol Toxin Reviews, 1998, 17(3): 361— 372.

[3] 廖士元. 青环海蛇毒对神经、心血管的生理作用[J]. 海洋药物, 1985(2): 11— 15.

[4] GOPALAKRISHNAKONE P. Sea snake toxinology[M]. Singapore: Singapore University Press, 1994. 96— 128.

[5] 段海清, 张兆山, 李淑琴, 等. 重组α-银环蛇毒素的纯化及活性分析[J]. 中国生物化学与分子生物学学报, 1999, 15(5): 747— 751.

[6] SAMBROOK J, MANIATIS T, FRISTCH E F. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[7] 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.

[8] INOUE K, NOJIMA H, OKAYAMA H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids[J]. Gene, 1990, 96: 23— 28.

[9] 张笑人, 葛海良, 王颖, 等. 人卵巢癌 cDNA 表达文库的构建[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1998, 5(4): 239— 241.

[10] 覃公平. 中国毒蛇学[M]. 第 2 版. 南宁: 广西科学技术出版社, 1998.

Construction of a cDNA Expression Library from
the Venom of *Lapemis hardwickii* Gray

ZHONG Xiao fen, WEI Jian wen, ZHAO Gui jun, WU Wen yan, XU An tong
(School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: A high quality cDNA expression library from the venom of *Lapemis hardwickii* was constructed using the pDNA3 eukaryotic expression plasmid as vector. It is the first cDNA library of sea snake in our country, and thirty-eight new genes were found. There are ten new toxic genes, including short neurotoxin genes, long neurotoxin genes, pIA2 gene, and cys riched venom genes.

Keywords: *Lapemis hardwickii*; venom; cDNA expression library