

白唇竹叶青蛇毒类凝血酶基因的克隆和序列分析*

宋锡迅,余晓东,林奕心,和七一,李恒

(重庆师范大学 生命科学学院 重庆市动物生物学重点实验室 重庆市生物活性物质工程研究中心,重庆 400047)

摘要 通过分析多种已知的毒蛇蛇毒类凝血酶(SVTLEs)基因序列同源性,以保守的N和C末端氨基酸序列设计引物,克隆得到白唇竹叶青(*Trimeresurus albolabris*)SVTLE基因并分析其序列。以毒腺总RNA为模板进行RT-PCR,纯化并克隆至pMD18-T。结果表明,该酶基因大小为777 bp,推测出其相应氨基酸序列含258个氨基酸残基,分子量为28.02 kD, pI值为6.07;其3个可能糖基化位点为NDT103~105、NNS121~123和NRT251~253;与其它毒蛇的已知SVTLEs基因比较分析,推测出其含6对二硫键即Cys31-162、Cys50-66、Cys98-256、Cys142-210、Cys174-189和Cys200-225;其催化活性中心氨基酸残基为His65、Asp110和Ser204。分子进化树分析表明,毒蛇SVTLEs一级结构的进化具有一定种属特征,可为蛇的系统分类提供参考。

关键词 白唇竹叶青,蛇毒类凝血酶(SVTLEs),克隆,序列分析

中图分类号:Q785

文献标识码:A

文章编号:1672-6693(2009)04-0038-05

蛇毒含多种生物活性成分,其中大部分是酶和多肽^[1]。蛇毒类凝血酶(Snake venom thrombin-like enzymes, SVTLEs)是其中的一类酶,具有抗凝、溶栓、去纤、扩张血管、改善微循环等多种功效,有的已经用于治疗心脑血管疾病,如ancrod和batroxobin等^[2]。自Itoh等^[3]首次成功地克隆出一种蝮蛇类凝血酶(巴曲酶)基因以来,越来越多的SVTLEs得到克隆和表达,如Pallabin^[4]、Acutin^[5]、Mucrosobin^[6]、Gussurobin^[7]、GPV-TL1和GPV-TL2^[8]等。本研究克隆出中国产的白唇竹叶青(*T. albolabris*)SVTLE基因序列,记为chitribisin,并与其它蛇毒SVTLEs基因序列比较,分析其同源性,同时构建分子进化树,分析其进化原因。

1 材料与方法

1.1 材料

白唇竹叶青毒蛇采自中国重庆。总RNA抽提试剂盒、One Step RNA PCR试剂盒(AMV)、DNA Ligation Kit Mighty Mix、pMD18-T vector、Bgl II、EcoR I限制酶等均购自宝生物工程(大连)有限公司。感受态大肠杆菌JM109为本实验室自制。DNA纯化回收试剂盒(离心柱型)和普通质粒小量抽提试剂盒均购自TIANGEN公司,引物由北京博迈

德科技发展有限公司合成。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 毒腺总RNA的抽提 剪下白唇竹叶青蛇头,迅速取出毒腺,置于液氮中研磨成粉末,其余步骤按照TaKaRa公司的总RNA抽提试剂盒说明进行。通过1%琼脂糖凝胶电泳和紫外分光仪检测抽提的总RNA的质量和浓度。

1.2.2 一步法RT-PCR扩增cDNA 取10×One Step RNA PCR buffer 10 μL、MgCl₂(20 mmol/L) 20 μL、dNTP混合物10 μL、正向引物(10 pmol/μL) 2 μL、反向引物(10 pmol/μL) 2 μL、RNase Inhibitor(40 U/μL) 2 μL、AMV Reverse Transcriptase XI(5 U/μL) 2 μL、AMV-Optimize Taq(5 U/μL) 2 μL、RNA 10 μL、RNase Free dH₂O 40 μL至总体积100 μL,然后进行RT-PCR反应。RT-PCR反应条件为50℃反转录30 min,95℃反转录酶灭活2 min,95℃变性30 s,60℃退火30 s,72℃延伸45 s,进行30个循环,最后72℃延伸5 min。取8 μL反应产物电泳检测,其余用TIANGEN公司的DNA纯化回收试剂盒纯化,溶于30 μL的洗脱缓冲液备用。

1.2.3 cDNA的克隆 DNA连接反应按pMD18-T vector试剂盒说明书进行,感受态细菌的制备、大肠

* 收稿日期 2009-04-07 修回日期 2009-06-22

资助项目:重庆市自然科学基金(No. CSTC2006BA503)

作者简介:宋锡迅,男,硕士研究生,研究方向为药用资源动物学,通讯作者,余晓东, E-mail: yxd@cqnu.edu.cn

杆菌的转化、等均按常规方法进行^[9-10]。质粒抽提按 TIANGEN 公司试剂盒说明书进行。

1.2.4 cDNA 全序列的测定 质粒经 PCR 和 Bgl II、EcoR I 双酶切鉴定为阳性克隆后,将其菌液送至北京三博远志生物技术有限责任公司完成序列测定。

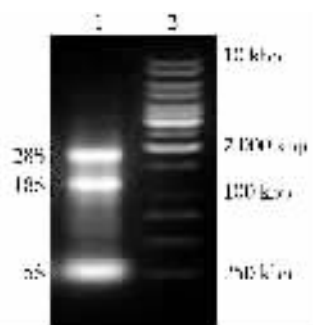
1.2.5 cDNA 和蛋白质序列分析 采用 DNAMAN 对 cDNA 序列进行推导,采用软件 CLUSTLX1.8 和 BO-XSHADE 3.21 对蛋白质进行多序列比较。

2 结果分析

2.1 cDNA 的扩增和克隆

根据已报道的竹叶青蛇属的 SVTLEs 基因序列^[8,11]设计引物;为了方便克隆,在研究中对引物的 5'端和 3'端分别引入 Bgl II 和 EcoR I 酶切位点。此外,还在正向引物的 5'端引入了 EK 酶酶切位点,以便于表达产物的纯化。两条引物序列如下:正向引物为 5'-AAA AGA TCT GGG TACC GAC GAC GAC GAC AAG ATG ATG CTG ATC AGA GTT CTA-3',反向引物为 5'-AAA GAA TTC TCA TGG GGG GCA TGT CAC-3'。

抽提得到的白唇竹叶青毒腺总 RNA 通过 1% 甲醛变性琼脂糖电泳分析(图 1),28S 和 18S 两条 rRNA 条带完整,说明 mRNA 未降解。经紫外分光仪检测,OD260/OD280 值为 1.93,浓度为 0.33 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。以上结果表明 RNA 的质量和浓度符合反转录的要求。



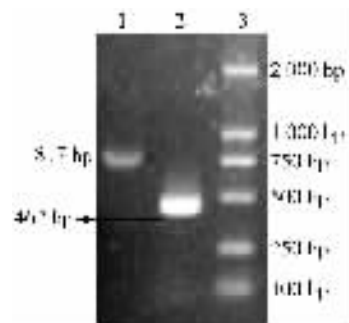
泳道 1:RNA,泳道 2:DNA marker。

图 1 白唇竹叶青毒腺总 RNA

Fig. 1 Total RNA of Chinese green pit viper

PCR 产物电泳分析在 820 bp 左右有一条特异的 DNA 条带(图 2)。将 PCR 产物克隆到质粒载体 pMD18-T 载体上,转化大肠杆菌 JM109 经过氨苄青霉素筛选,在 LB 平板上挑取 12 个白色菌落,然后抽提质粒,通过 PCR 和 Bgl II/EcoR I 双酶切反应鉴定重组子(图 3),选择了 2 个克隆,分别测定了序

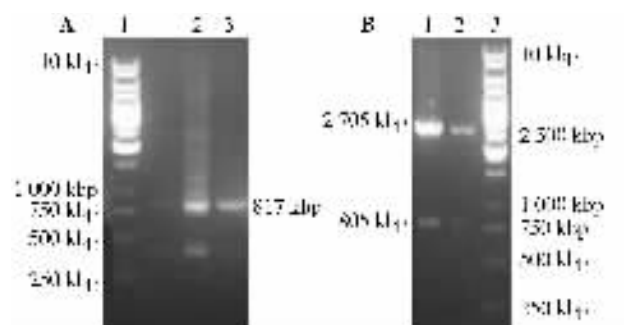
列,所测结果一致,见序列于(图 4)。



泳道 1:PCR 扩增产物,泳道 2:内参(pSPTet3 质粒)扩增产物,泳道 3:DL2000 Marker。

图 2 一步法 RT-PCR 扩增产物

Fig. 2 The products of one step RT-PCR



(A) 泳道 1:GeneRulerTM 1 kb DNA ladder,泳道 2,3 817 bp 的条带为目的片段(B)泳道 1 2693 bp 的条带为酶切后的 pMD18-T 片段;泳道 2 805 bp 的条带为目的基因片段,泳道 3:GeneRulerTM 1 kb DNA ladder。

图 3 pMD18-T/chitribrisin 克隆质粒的 PCR 鉴定和 Bgl II/EcoRI 双酶切鉴定

Fig. 3 The PCR identification of pMD18-T/chitribrisin plasmid and the identification Bgl II/EcoRI cleavage of pMD18-T/chitribrisin plasmid

2.2 SVTLE 基因的核苷酸序列及氨基酸序列分析

除合成 5'和 3'末端引物外,还合成了一系列的中间引物,最后得到一条 777 bp 的核苷酸序列(图 4);起始密码子为 ATG(核苷酸 1~3),终止密码子为 TGA(核苷酸 775~777)。编码 258 个氨基酸残基,蛋白分子量大小为 28.02 kD, pI 值为 6.07,有 3 个可能的糖基化位点即 NDT103~105、NNS121~123 和 NRT251~253。通过和其他类凝血酶比较,推导出 chitribrisin 包括 18 个氨基酸的信号肽,6 个氨基酸的前肽和 234 个氨基酸的成熟肽(图 4)。与其它类凝血酶一样,此酶具有高度保留的活性中心,即 His65、Asp110 和 Ser204(成熟氨基酸中的顺序)。另外,维持稳定空间结构的 6 对二硫键即 12

个半胱氨酸也完全保留,分别为 Cys31-162、Cys50-66、Cys98-256、Cys142-210、Cys174-189 和 Cys200-225。其中 Cys98- 256 为蛇毒蛋白酶所特有的。

2.3 多序列比对

多序列比对的结果显示中国产的白唇竹叶青蛇 chitribrisin 与 *T. stejnegeri* 的 serine protease CL2 precursor(Q71Q12)和 stejnobin(Q8AY81)、*T. albolabris* 的 GPV-TLX(ABS12075)的同源性分别为 83. 72%、71. 54% 和 70% ;与 *Gloydus saxatilis* 的 defibrase(Q7SZE1)、*Bothrops atrox* 的 batroxobin(AAA48553)和 *Calloselasma rhodostoma* 的 anero(AAA49195)的同源性分别为 65. 89%、62. 06% 和 57. 69%(图 5)。可见, chitribrisin 与竹叶青属几种类凝血酶的同源性高于非竹叶青属的几种类凝血酶。

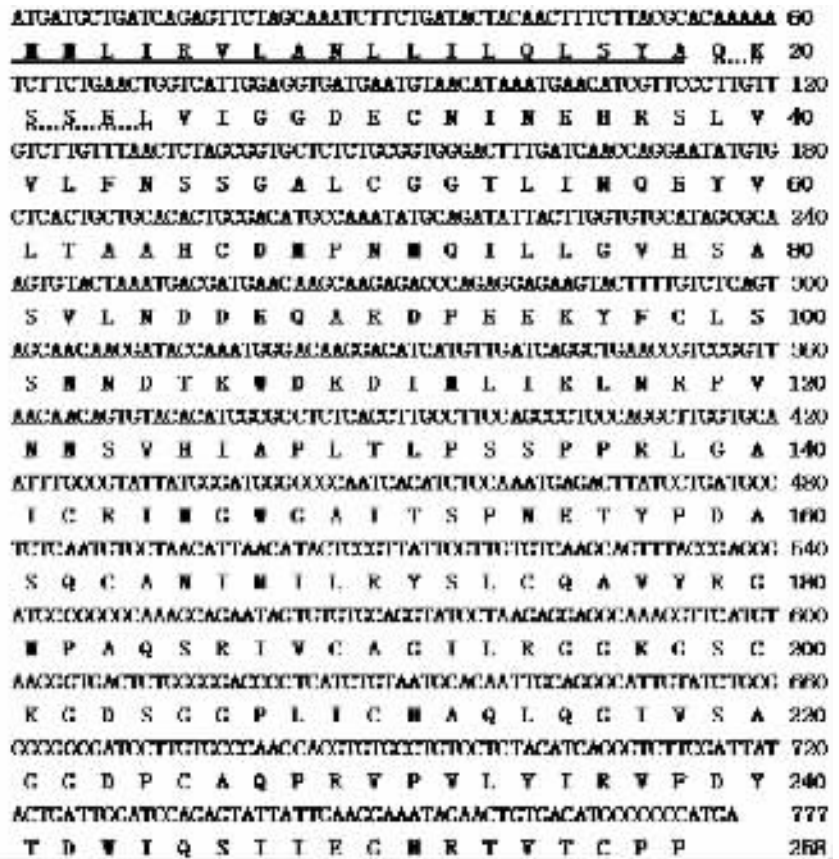
2.4 分子进化树

图 6 显示包括 chitribrisin 在内的十几种 SVTLEs 的分子进化趋势与形态学大致一致,且种间差异大于种内差异,属间差异大于属内差异。同时该图也反映出 SVTLEs 在进化上也是存在多样性的。

3 讨论

随着分子生物学和生物信息学的快速发展,特别是一些生物分析软件的开发使用,极大地提高了对序列的分析效率和效果。现在可以容易地比较各种序列,分析它们之间的联系和差别。例如,通过对远缘分子系统学的一个有力工具, DNA 序列分析还被广泛应用于生物的分类和进化关系研究^[13]。

本研究利用多序列比对,验证了所得 chitribrisin 的 cDNA 序列与其他 SVTLEs 的序列具有共同特征:类凝血酶都具有高度保守的活性中心序列,其中含有 His、Asp 和 Ser 残基组成的酶活性中心,多数类凝血酶都具有 6 对二硫键,而且表现出一定的种属特征性。本研究通过保守的信号肽及终止区域的基因序列,设计合适的引物,测定并克隆了白唇竹叶青



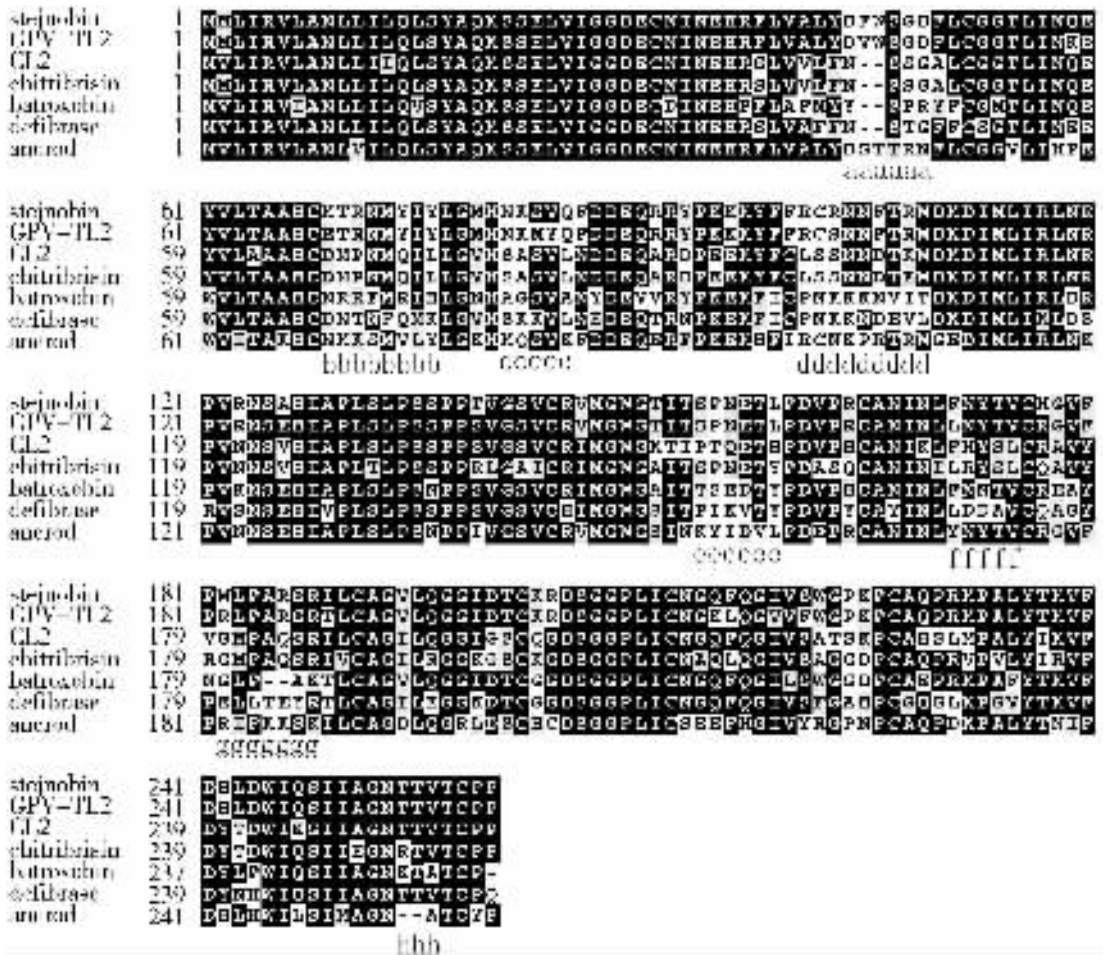
黑色下划线部分为信号肽(1~18);虚线部分为前肽(19~24);其余为成熟肽(25~258)。

图 4 白唇竹叶青蛇毒类凝血酶基因 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 4 The cDNA sequence and the deduced protein sequence of chitribrisin from the venom glands of Chinese green pit viper

SVTLEs 的基因序列,推导出其氨基酸序列,并确定二硫键位置。通过与其他竹叶青属类凝血酶同源性的比对,发现它们有较高的同源性。经过多次测序验证表明得到的白唇竹叶青类凝血酶 cDNA 序列结果是可靠的。本研究成功克隆 chitribrisin 基因,将来能够在原核或真核生物中得到高效表达,从而获得具有高效活性的 chitribrisin,以节省日益减少的蛇毒资源。

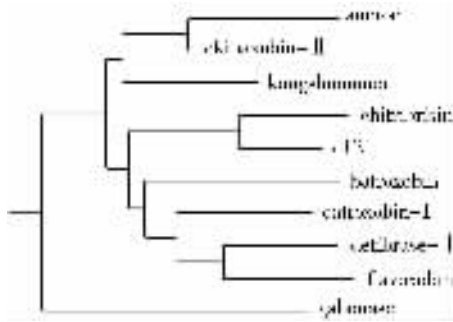
另一方面,比对结果没有发现核苷酸序列完全相同的两个 cDNA 分子,也反映出类凝血酶分子结构的多样性。判断造成 SVTLEs 多样性的原因有以下几类^[14]:(1)基因的点突变;(2)外显子的变位剪接;(3)RNA 编辑;(4)重组交换或重组交换引起的基因转变;(5)外 DNA 片段的融合。另外推测还极有可能有几种方式^[15]:体细胞水平上发生基因重排或体细胞突变;一些新的有适应意义的蛋白质分子,通过类似于蛋白质回归或反转录转座的方式在基因



黑体部分的字母代表所比较的类凝血酶相同的氨基酸残基;从 a 到 h 的小写字母代表蛇毒类凝血酶的高变异区;破折号“-”代表氨基酸的缺失。

图 5 chitribrisin 与其它蛇毒类凝血酶的氨基酸序列比较

Fig. 5 Multiple-sequence alignment of chitribrisin to other snake venom thrombin-like serine proteases



图中的 SVTLEs 由上到下分别来自 *C. rhodostoma*, *O. okinavensis*, *G. blomhoffi brevicaudus*, *Chinese T. albolabris*, *T. stejnegeri*, *B. atrox*, *C. atrox*, *G. saxatilis*, *T. flavoviridis* 和 *B. gabonica*

图 6 蛇毒类凝血酶遗传进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of thrombin-like Enzymes

组中得到固定,基因重复等。在功能上,不同的类凝血酶具有其自身特性,如部分 SVTLEs 导致水肿、诱导血小板凝集等其他生物学功能^[16]。SVTLEs 基因的获得为其生物学功能研究奠定了基础。

参考文献:

[1] 林奕心,余晓东 和七一 等. 蛇毒类凝血酶研究进展 [J]. 重庆师范大学学报(自然科学版) 2009 26(2) 27-32.

[2] 覃公平. 中国蛇毒学 [M]. 南宁 : 广西科技出版社, 1998 : 1-20.

[3] Itoh N ,Tanaka N ,Mihashi S ,et al. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for batroxobin ,a thrombin-like snake venom enzyme [J]. J Biol Chem ,1987 ,262 : 3132-3135.

[4] Fan C Y ,Qian Y C ,Yang S L ,et al. Halys pallas [J]. Biochem Mol Biol Int ,1999 47(2) 217-225.

[5] Pan H ,Du X Y ,Zhou Y C ,et al. Acutus [J]. Biochem Biophys Res Commun ,1999 255(2) 412-415.

[6] Guo Y W ,Chang T Y ,Lin K T ,et al. *Mucrosquamatus* (Taiwan habu) [J]. Protein Exp Purif 2001 23(3) 483-490.

[7] Yang Q ,Hu X J ,Xu X M ,et al. Ussuriensis [J]. Biochim Biophys Acta 2002 34(1) :6-10.

- [8] Rojnuckarin P ,Muanpasitporn C ,Chanhome L ,et al. Albolabris venom gland cDNA library[J]. *Toxicon* ,2006 ,47 (3) :279-287.
- [9] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 2 版. 北京 :中国协和医科大学出版社 ,1998 288-289.
- [10] 萨姆布鲁克 J ,拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂 ,译. 3 版. 北京 :科学出版社. 2003 87-93.
- [11] 李文辉 ,高荣 ,张云. 竹叶青蛇毒丝氨酸蛋白酶的分子克隆和序列比较[J]. *动物学研究* ,2003 ,24(3) :180-185.
- [12] 阎隆飞 ,孙之荣. 蛋白质分子结构[M]. 北京 :清华大学出版社 ,1999.
- [13] Knight A ,Mindell D P. On the phylogenetic relationships of colabrinae ,elapidae and viperidae devolution of front fanged venom system in snakes[J]. *Copia* ,1994 ,1 :1-9.
- [14] 查向东. 尖吻蝮蛇毒 C 型凝集素类蛋白质及类凝血酶 cDNA 克隆、结构分析和重组表达研究[D]. 合肥 :中国科学技术大学 ,2002.
- [15] Courseaux A ,Nahon J L. Birth of two chimeric genes in the hominidae line age[J]. *Science* ,2001 ,291(5507) :1293-1297.
- [16] Deshimaru M ,Ogawa T ,Nakashima K I. Accelerated evolution of crotalinae snake venom gland serine proteases [J]. *FEBS Lett* ,1996 ,397 83-88.

Cloning and Sequencing of the Thrombin-like Enzyme Gene from the Venom Glands of Chinese Green Pit Viper (*Trimeresurus albolabris*)

SONG Xi-xun , YU Xiao-dong , LIN Yi-xin , HE Qi-yi , LI Heng

(Chongqing Engineering Research Center of Bioactive Substance , Chongqing Key Laboratory of Animal Biology , College of Life Sciences , Chongqing Normal University , Chongqing 400047 , China)

Abstract : In order to get the SVTLE gene of *Trimeresurus albolabris* and analyze its sequence , two primers are designed with reference to the known conservative N and C-termiuns amino acid sequences of SVTLEs from other toxic snakes. Total RNA is isolated from venom glands of *T. albolabris* , as amplified by one step RT-PCR , the product is purified and cloned into pMD18-T. The corresponding amino acid sequence is got by screeneing positive clones and sequencing. The results show that the encoding gene of SVTLE gene of *T. albolabris* is successfully cloned and apart from the primers , the length of encoding cDNA is 777 bp ; its deduced amino acid sequence has 258 acid residues , its molecular weight is about 28.02 kD and its pI is 6.02. Three possible sites of glycosylation are NDT103 ~ 105 , NNS121 ~ 123 and NRT251 ~ 253. With the comparative analysis of the known encoding gene of SVTLE from other snakes , the multiple alignments reveal that the SVTLE of *T. albolabris* had six disulfide bonds Cys31-162 , Cys50-66 , Cys98-256 , Cys142-210 , Cys174-189 and Cys200-225. It has three amino acid residues (His65, Asp110 and Ser204) at its catalytic active center. The molecular phylogenetic tree shows that some differences has occured at the primary structure among SVTLEs from toxic snakes , which may contribute to snkae taxonomy.

Key words : *Trimeresurus albolabris* ; SVTLEs ; cloning ; sequence analysis

(责任编辑 方 兴)