

# 桂北五步蛇纤溶酶金属蛋白酶原基因的初步研究\*

## Primary Study of cDNA Encoding Fibrinolysin Metalloproteinase from the Venom of *Agkistrodon acutus*

杨海波 樊晓晖 何先保 黄企光 黎肇炎 Franc Gubensek\*\*  
 Yang Haibo Fan Xiaohui He Xianbao Huang Qiguang Li Zhaoyan

(广西医科大学微生物教研室 南宁市滨湖路6号 530021)

(Guangxi Medical University, 6 Binhulu, Nanning, Guangxi, 530021, China)

**摘要** 从桂北五步蛇毒腺中抽提蛇毒总 RNA, 采用一步法 (RT-PCR和 PCR在同一试管内进行) 扩增纤溶酶金属蛋白酶原基因, 并进行电泳检测, 可见 3条特异的 DNA条带, 分别约为 1.5Kb, 1.3Kb和 800bp, 利用平端连接的方法将其中的 800bp PCR产物克隆至 pGEM-T Easy载体, 挑选白色菌落, 用酶切和 PCR法对其进行鉴定。

**关键词** 五步蛇 纤溶酶金属蛋白酶原 PCR 基因克隆

中图法分类号 Q 959.606

**Abstract** One step method was used to extract total RNA from the venom of *Agkistrodon acutus* which was found in the northern mountain area of Guangxi province. The cDNAs encoding fibrinolysin metalloproteinase were amplified by one step method (RT-PCR and PCR reactions occurred in the same test tube). The PCR product is about 1.5 Kb, 1.3 Kb and 800bp. The 800 bp PCR product was cloned into the pGEM-T Easy vector. Plasmid DNA was obtained from positive clones, identified by means of digestion with EcoR I and PCR reaction.

**Key words** *Agkistrodon acutus*, fibrinolysin metalloproteinase, PCR, gene clone

蛇毒含有多种成分,是由多种氨基酸组成的多肽类物质或蛋白质。五步蛇蛇毒中含有血液循环毒素,其中与血凝失调有关的 1种蛋白水解酶是类凝血酶和金属蛋白酶家族。纤溶酶属于金属蛋白酶家族的成员,它作用在人的纤维蛋白酶原或纤维蛋白,引起血凝块溶解,具有极高的应用价值<sup>[1,2]</sup>。本文就桂北五步蛇纤溶酶金属蛋白酶原基因进行初步研究,现报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

五步蛇 (*Agkistrodon acutus*)产地为广西北部山区 (桂北); 焦碳酸二乙酯 (DEPC) 为 Sigma公司产品, SV总 RNA分离试剂盒、pGEM-T Easy Vector Systems 为 Promega公司产品; TaKaRa one Step RNA PCR Kit (AMV)试剂盒、感受态受体菌 JM 109

购自宝生物工程 (大连)有限公司; Taq DNA聚合酶购自上海生工生物工程技术有限公司; PCR产物纯化用的 GENECLEAN II KIT为 Bio 101公司 (USA)产品; 其他试剂均为国产分析纯试剂。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 寡核苷酸的合成

参照文献 [3]设计一对上游和下游引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成,序列如下:

Primer 1: 5' CCAAATCCAGTCTCCAAAATG3'

Primer 2: 5' TTCCAGCTCCATTGTTGGTTA3'

#### 1.2.2 蛇毒总 RNA的提取

以 0.1% DEPC浸泡提取总 RNA的器皿,五步蛇断头后,立即取出毒腺,取 30 mg左右的毒腺组织于冰浴中研磨,其余毒腺立即置入液氮中保存备用;总 RNA的提取按照 Promega SV Total RNA Isolation System 试剂盒推荐的方法进行。通过紫外光吸收检测抽提的总 RNA的质量和浓度。

#### 1.2.3 DNA的合成和 PCR体外扩增

按照 TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV)试剂盒推荐的方法 (一步法)进行。反应体系中加入蛇毒总 RNA样品 1 $\mu$ l, 上游及下游引物各 1 $\mu$ l, AMV

2000-05-18收稿, 2000-07-17修回。

\* 广西青年科学基金会资助项目 (桂青自 9912018)。

\*\* Dept of Biochemistry and Molecular Biology, Jozef Stefan Institute, Slovenia.

Reverse Transcriptase XL (5 U  $\mu$ l) 1  $\mu$ l, 10 $\times$  One Step RNA PCR Buffer 5  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> (25 mM) 10  $\mu$ l, RNase Inhibitor (40 U  $\mu$ l) 1  $\mu$ l, AMV-Optimized Tag (5 U  $\mu$ l) 1  $\mu$ l, dNTP Mixture (各 10 mM) 3  $\mu$ l, RNase Free dH<sub>2</sub>O 24  $\mu$ l 反应条件如下: 50 $^{\circ}$ C 15 min 以合成 cDNA, 94 $^{\circ}$ C 2 min 使 cDNA 变性及灭活逆转录酶 (AMV), 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 共进行 25 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 保温 5 min 取 10  $\mu$ l 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测

#### 1.2.4 PCR 产物的纯化

取 20  $\mu$ l PCR 产物电泳, 切下含所需 DNA 的琼脂糖凝胶块, 按照 GENECLEAN II KIT 试剂盒推荐的方法进行纯化。

#### 1.2.5 cDNA 的连接反应 克隆、大肠杆菌的转化

参照文献 [4] 及 pGEM-T Easy Vector Systems 试剂盒推荐的方法进行连接、克隆, 反应体系中加入 PCR 产物 (已纯化) 5  $\mu$ l, T<sub>4</sub> DNA Ligase 1  $\mu$ l, T<sub>4</sub> DNA Ligase 10 Buffer 1  $\mu$ l, pGEM-T 1  $\mu$ l, dH<sub>2</sub>O 1  $\mu$ l 按 TaKaRa E. coli competent cells 试剂盒推荐的方法进行转化。

#### 1.2.6 阳性克隆质粒的抽提和鉴定

质粒的抽提参照文献 [5] 进行, 菌液离心后用 STET 重悬, 加入 NaOH CH<sub>3</sub>COONa, 离心后弃去沉淀, 加入 0.1 体积异丙醇, 离心后去上清, 用 70% 乙醇洗涤, 重溶于 TE 缓冲液中, 用 PCR 和酶切法 [6] 进行鉴定。

## 2 结果

### 2.1 蛇毒总 RNA 的提取

抽提及纯化得到的蛇毒总 RNA 用紫外分光仪检测, A<sub>260nm</sub>/A<sub>280nm</sub>=1.8 A<sub>260nm</sub>/A<sub>230nm</sub>=2.2, 浓度为 4.2  $\mu$ g  $\mu$ l 表明 RNA 的质量和浓度符合反转录的要求。

### 2.2 cDNA 的克隆

对蛇毒总 RNA 进行逆转录 PCR 和 PCR 扩增 (RT-PCR 和 PCR 在同一管内进行) 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物, 可见有 3 条 DNA 特征带, 分别约为 1.5 Kb 1.3 Kb 和 800 bp (图 1)。

### 2.3 PCR 产物的纯化

纯化结果见图 2, 所得产物溶于 20  $\mu$ l TE Buffer 备用。

### 2.4 DNA 的连接反应 克隆 大肠杆菌的转化

按试剂盒推荐的方法将 800PCR 产物克隆到 pGEM-T 载体, 转化大肠杆菌 JM 109, 将转化菌接种至 X-gal 平板上, 培养后见兰、白两种菌落生长。

## 2.5 阳性克隆质粒的抽提和鉴定

挑取白色阳性菌落抽提质粒 通过 PCR 和 EcoRI 酶切反应鉴定重组子。扩增及酶切后产物进行琼脂糖凝胶电泳分析, 均见 800bp 的 DNA 条带。

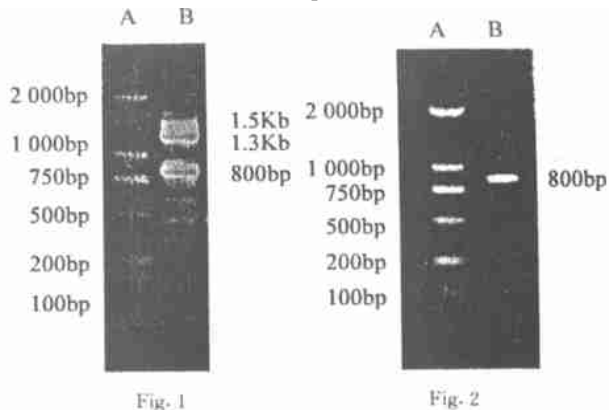


Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR product

A: DNA markers; B: PCR product

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of purified PCR product

A: DNA markers; B: purified PCR product

## 3 讨论

蛇毒金属蛋白酶属金属蛋白酶 M1 家族中的亚家族, 根据其蛋白质结构和已报道的酶原 DNA 序列, 蛇毒金属蛋白酶分成 4 类 [7]: P-I、P-II、P-III 和 P-IV, 4 类蛇毒金属蛋白酶原都有相似的信号肽、前肽和蛋白酶结构域, 主要区别在于羧基端的结构域。

我们参考范春阳等 [3] 的报道设计的引物经过 RT-PCR 和 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物, 在大约 1.5 Kb 1.3 Kb 和 800 bp 处有 3 条特异的 DNA 条带, 其中 1.5 Kb 1.3 Kb 2 条和范春阳等 [8] 报道的位置相似, 另外 1 条 800 bp 为我们实验室新发现的 DNA 条带, 推测五步蛇蛇毒中含有多种金属蛋白酶, 可能一对兼并引物同时扩增出 2 种金属蛋白酶原的 DNA 序列; 从进化的角度来看, 广西北部山区五步蛇蛇毒纤溶酶的基因结构和其他地方的五步蛇纤溶酶基因结构可能存在差异。对于本实验扩增到的五步蛇纤溶酶金属蛋白酶基因 800 bp PCR 产物, 有待于我们进行序列分析, 并与已报道的金属蛋白酶原基因家族进行比较, 以确定是否为一新发现的基因。

### 参考文献

- Liu Q D, Xu W H, Cheng X et al. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding hemorrhagic toxin acutolysin A from *Agkistrodon acutus*. *Toxicon*, 1999, 37: 1539-1548.

(下转第 318 页 Continue on page 318)

该新种近似于二斑悠背蚱 (*Euparatettix bimaculatus* Zheng)，主要区别见表2

表2 条斑悠背蚱与二斑悠背蚱的主要区别

Table 2 The main differences between *Euparatettix strimaculatus* sp. nov. and *Euparatettix bimaculatus* Zheng

二斑悠背蚱 <i>Euparatettix bimaculatus</i> Zheng	条斑悠背蚱 <i>Euparatettix strimaculatus</i> sp. nov.
前胸背板前缘平截 Anterior margin of pronotum truncate	前胸背板前缘呈钝角形突出 Anterior margin of pronotum produce in an obtuse angle
前胸背板后突超过后足股节顶端部分长 2.5 mm The length of pronotum which reaches over the top of hind femur about 2.5 mm	前胸背板后突超过后足股节顶端部分长 1.5 mm The length of pronotum which reaches over the top of hind femur about 1.5 mm
后翅超过前胸背板后突顶端部分长 3mm The length of hind wing which reaches over the top of hind process about 3 mm	后翅超过前胸背板后突顶端部分长 2.2mm The length of hind wing which reaches over the top of hind process about 2.2 mm
前胸背板在肩部后具二个大三角形黑斑 With a pair of big black triangle maculae between shoulders	前胸背板在肩部两侧具二个弧形黑带 With a pair of black arc maculae between shoulders

(上接第308页 Continue from page 308)

- Gong W M, Zhu X Y, Liu S J et al. Crystal structure of acutolysin A, a threedisulfide hemorrhagic zinc metalloproteinase from the snake venom *Agkistrodon acutus*. *J Mol Biol*, 1998, 283: 657-658.
- 范春阳, 钱友存, 沈雁等. 五步蛇毒血小板凝集抑制因子 cDNA 的克隆及表达. *生物化学与生物物理学报*, 1999, 31 (5): 531-536.
- 彭秀玲, 袁汉英, 谢毅等. 基因工程实验技术. 第2版. 湖南: 湖南科学技术出版社, 1997. 107-121.
- 李永奇. 一种快速单管微量提取质粒方法. *细胞与分子免疫学杂志*, 1999, 5 (1): 63.

参考文献

- 郑哲民. 西双版纳地区蚱总科的研究 (直翅目). *动物分类学报*, 1998, 23 (2): 161-184.
- 郑哲民, 蒋国芳. 广西大瑶山地区蚱科的新种 (直翅目: 蚱总科). *华东昆虫学报*, 1996, 5 (2): 1-6
- 郑哲民, 蒋国芳. 中国蚱科三新种记述 (直翅目: 蚱总科). *动物学研究*, 1997, 18 (2): 151-155.
- 梁铭球, 郑哲民. 中国动物志 (昆虫纲). 第12卷. 直翅目: 蚱总科. 北京: 北京科学出版社, 1998. 1-278.
- 蒋国芳, 郑哲民. 广西蝗虫. 桂林: 广西师范大学出版社, 1998.
- Harz K. The Orthoptera of Europe, Vol. II. Dr W Junk B V-publishers-The Hague, 1975, 23-41.
- Podgornaya L I. Straight-winged insects of the family tetrigidae of the fauna of U SSR. *Trudy zoologicheskoga Instituta Akadeniya Nauk USSR*, 1983,
- 郑哲民. 直翅目: 菱蝗科. 见: 横断山区昆虫. 第册. 北京: 科学出版社, 1992. 82-86.
- 郑哲民. 直翅目: 蚱总科. 见: 龙栖山动物. 北京: 中国林业出版社, 1993. 70-83.

(责任编辑: 邓大玉)

疫学杂志, 1999, 5 (1): 63.

- J. 萨姆布鲁克, E F 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南. 第2版. 北京: 科学出版社, 1996. 42-55.
- Bjarnrson J B, Fox J W. Snake venom metalloendopeptidase reptolysins. *Methods Enzymol*, 1995, 248: 345-368.
- Du X Y, Pan H, Jin Y et al. Purification, cDNA cloning and molecular characteristic of a fibrinolytic enzyme from the venom of *Agkistrodon acutus*. *J Nat Toxins*, 1998, 7: 159-172.

(责任编辑: 邓大玉)