

广西产眼镜王蛇毒 α -神经毒素基因的分子克隆及序列分析

Cloning and Sequence Analysis of the cDNA Encoding of α -Neurotoxin from Guangxi King Cobra (*Ophiophagus hannah*)

李其斌 黄光武 赵晓琴

Li Qibin Huang Guangwu Zhao Xiaoqin

渡庆次贺博* 金城记代彦* 中村真理子* 小杉忠诚*

Y. Togesi K. Kinjoh M. Nakamura T. Kosugi

(广西医科大学第一附属医院急诊科蛇伤救治与蛇毒临床应用研究中心 南宁市滨湖路 6号 530021)

(Snakebite Research Department, The first Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, 6 Binhulu, Nanning, Guangxi, 530021, China)

摘要 为获得眼镜王蛇 (*Ophiophagus hannah*, 简称 Oh) 蛇毒 α -神经毒素 (α -NT) 的基因序列, 依据眼镜蛇科不同毒蛇种类来源的 α -NT 基因有较高的同源性, 设计 1 对上下游引物, 为克服引物带来模糊扩增, 在蛋白编码部分再设计 1 对上下游特异引物, 用 Nucleospin RNA Kit 法从 3 条活眼镜王蛇毒腺中提取 mRNA, 以 3' 端引物合成的 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增反应, 测定产物的核苷酸序列, 得到全长 474bp 的眼镜王蛇 cDNA 基因核苷酸序列。该核苷酸序列的信号肽与眼镜蛇树属 *Pseudonnaja textilis* (Pt)、海蛇 *Laticauda semifasciata* (Ls) 100% 同源, 与眼镜蛇南洋亚种 *Naja sputatrix* (Ns)、银环蛇 (*Bungarus multicinctus*) (Bm) 96.8% 同源; 蛋白密码部分有 83.3% 与 Ns, 79.2% 与 Pt, 76.4% 与 Ls, 74.1% 与 Bm 同源。信号肽后紧接着的 72 个氨基酸有 90.3% 与已发现的眼镜王蛇毒长链 α -NT Toxin a 同源, 大约有 73.6% 与 Toxin b, 69.7% 与 Oh-4, 66.7% 与 Oh-5, 56.9% 与 Oh-6A 和 6B 同源, 并与 α -银环蛇毒素 54.2% 同源。说明新发现的眼镜王蛇 cDNA 是一条长链 α -NT 基因。

关键词 眼镜王蛇 α -神经毒素 基因序列

中图分类号 R966.3

Abstract To obtain the cDNA sequence of α -neurotoxin (α -NT) from Guangxi king cobra (*Ophiophagus hannah*, Oh), the sense primer was designed from the 5' conserved regions with the start codon ATG, and the antisense primer was used as the d(T) for amplification of cDNA 3' end (RACE-PCR). Two primers were designed from the 5', 3'-coding regions for overcoming the mistake amplification by the primer. The venom gland RNA was extracted from three Oh snakes with the isolation kit. The extracted RNA was reversely transcribed into cDNA with the oligo(dT) antisense primer. The nucleotides sequence was analyzed on the ABI PRISM 310 automatic DNA sequencer. The nucleotide sequence of 474 base pairs consisting of a 5'-untranslated region (6bp), signal peptide with ATG (63 bp), protein coding region (216 bp) and 3'-untranslated region (186 bp) with a TGA termination codon was obtained. The comparison of the cDNA of long chain α -NT between Oh snakes and other snakes reveals that the nucleotide sequence is much higher corresponding to the signal peptide than the mature protein coding regions which is 100% identical to *Pseudonnaja textilis* (Pt) and *Laticauda semifasciata* (Ls), 96.8% to *Naja sputatrix* (Ns) and *Bungarus multicinctus* (Bm). The conservation of mature protein regions are about 83.3% to Ns, 79.2% to Pt, 76.4% to Ls and 74.1% to Bm snakes. It is found that the conservation of Oh α -NT from cDNA 90.3% is identical to Oh α -NT Toxin a, about 73.6% to Oh Toxin b, 69.7% to Oh-4, 66.7% to Oh-5, 56.9% to Oh-6A and Oh-6B; and 54.2% to α -bungarotoxin. The result indicates that the Oh cDNA is a long chain α -NT gene.

Key words *Ophiophagus hannah*, α -neurotoxin, cDNA sequence

2001-02-01 收稿, 2002-03-26 修回。

* 日本琉球大学医学部生理学科 (Department of Physiology, School of Medicine, University of the Ryukyus, Okinawa, Japan).

眼镜王蛇 (*Ophiophagus hannah*) 又名过山风, 山万蛇, 是世界上最大的毒蛇, 其蛇毒含多种生物毒素, 其中含 α 神经毒素 (α -NT) 有 9 种之多。 α 神经毒素具有止痛、抗毒瘾等重要的作用, 有很好的开发应用前景^[1], 然而, 眼镜王蛇是国家二级保护动物, 资源有限, 人类利用 α 神经毒素, 不能直接从眼镜王蛇体内提取, 需要利用当代科技手段, 人工生产 α -NT 毒素。 目前已有几种眼镜王蛇的 α -NT 进行了氨基酸序列测定^[6-9], 但均未进行基因分析。 我们采用近年来发展起来的 PCR 技术, 对广西产眼镜王蛇体内提取毒腺组织提取 α -NT 的基因, 并与基因库中及已发表的眼镜蛇科不同种类毒蛇的 α -NT 基因进行对比分析, 为进一步探讨眼镜王蛇毒 α -NT 的分子结构、中毒机理和开发应用提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 组织材料

眼镜王蛇活体由广西医科大学蛇毒研究所蛇园提供, 共 3 条。 分别对 3 条活蛇进行取材和实验对比, 以准确确定蛇种。

1.2 主要试剂和仪器

NucleoSpin RNA Kit 购自美国 (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA, USA), M-MLV 逆转录酶购自美国 (Life Technologies, Rockville, Mo, USA), Tag DNA 聚合酶由美国 (Promega, Co., Madison, WI, USA) 生产。 PCR 扩增仪 Program Temp Control System PC-800 为日本 Astec 公司产品。 琼脂糖凝胶 NuSieve GTG agarose 由美国 (FMC BioProducts, Rockland, ME, USA) 生产。 NucleoSpin Extraction Kit 购自美国生产。 测定 RNA 和 DNA 含量用的 BioSpec-1600 DNA/Protein/Enzyme Analyzer 为日本生产。 DNA 自动测序仪 ABI PRISM 310 Genetic Analyzer 为美国生产。

1.3 实验方法

1.3.1 总 RNA 抽取

采用说明书上的 Nucleopin RNA Kit 法从眼镜

王蛇体内取出新鲜活毒腺体组织约 0.1g 后进行总 RNA 抽取。 整个操作过程在 30 min 内完成。

1.3.2 RT 反应 (逆转录合成 cDNA)

取 $10 \mu\text{l}$ RNA 样本, $5 \mu\text{l}$ 逆转录缓冲液、 $5.5 \mu\text{l}$ 4 种核苷三磷酸、 $2.5 \mu\text{l}$ (0.1M) 二硫苏糖醇和 $0.3 \mu\text{l}$ 逆转录引物 RT-1 (oligo DT) 于反应管内, 置于 75°C 下 2 h, 得到 1 条 cDNA 作为 PCR 模板使用。

1.3.3 PCR 扩增目的基因

1.3.3.1 引物设计

比较研究基因库中及已发表的眼镜蛇科不同种类毒蛇的毒素 α -NT 基因, 发现有较高的同源性, 特别是 5' 端和 3' 端非翻译区及引导肽部分高度保守后, 据此设计包括翻译起始点的 5' 端上游引物 (P 和 或 P4):

5'-GCAAGATGAAAACCTCTGCTGCTGACC-3'
以及为了得到 3' 端较完整非编码部分而设计了基本上属于 D(T) 的下游引物 (P 和 或 P4):

5'-CAGTGGTAACAACGCAGAGGCC (T) 31VN-3'

为了克服引物所带来的模糊扩增, 在蛋白编码部分再设计一对上下游特异引物。 上游引物 (P 和 或 P3) 为:

5'-GACTCTGAACAGGTCGACCCG-3';
下游引物 (P 和 或 P2) 为:

5'-CAACGCCATGTTGGAAATGGGTTGC-3'
由 4 对引物 (P1 P2 P3 P4) 进行 PCR 扩增目的基因 (图 1)。

1.3.3.2 PCR 反应

在反应管中加入 $0.5 \mu\text{l}$ cDNA 模板, $2 \mu\text{l}$ PCR 缓冲液, $2 \mu\text{l}$ 4 dNTP (2.5 mM) MgCl₂ $0.2 \mu\text{l}$ Tag DNA 聚合酶每毫升 5 单位, $0.5 \mu\text{l}$ 引物 (50 pmol) 和 $12.8 \mu\text{l}$ dH₂O 后立即置入 PCR 扩增自动温度循环仪。 反应条件: 最初 $94^\circ\text{C} \times 2 \text{ min}$ 变性后, 再进行变性 ($94^\circ\text{C} \times 30 \text{ s}$) 退火 ($58^\circ\text{C} \times 30 \text{ s}$) 和延伸 ($74^\circ\text{C} \times 1 \text{ min}$) 30 个 PCR 循环。 最后一个循环结束后再延伸反应 $74^\circ\text{C} \times 5 \text{ min}$ 以补全所有单链的末端。

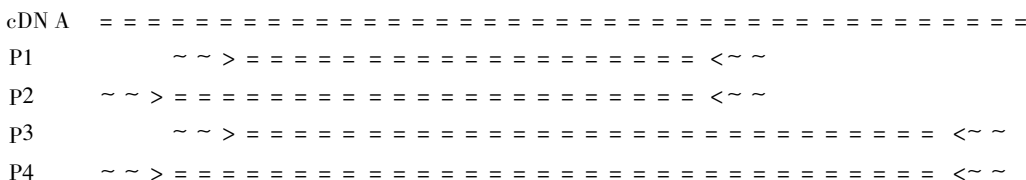


图 1 眼镜王蛇 (*Ophiophagus hannah*) α 神经毒素 cDNA 扩增图
Fig. 1 Diagram of amplification of α -NT cDNA of *Ophiophagus hannah*
箭头表示引物 The arrows indicate the primers

1.3.4 PCR产物制备

将 PCR产物置于 2.5% NuSieve GTG agarose 凝胶电泳,紫外灯下快速切下产物条带后用 Nucleo Spin Extraction Kit纯化,得到经 PCR扩增的基因克隆产物。

用 BioSpec-1600 DNA/Protein/Enzyme 分析仪测定 RNA和 DNA含量

1.3.5 核苷酸序列测定

采用 ABI PRISM TM310基因自动测序仪测定产物的核苷酸序列。根据测序仪的说明书进行操作

2 结果

以 cDNA作为模板,经 4引物进行 PCR扩增,均得到单一条带,见图 2

把测定得到的核苷酸序列进行对比分析,排除模糊扩增序列后得到全长 474的核苷酸序列信息(图 3)。该序列包括 5'端 6bp 信号肽伴启动子 ATG在内 63bp 蛋白密码部分 216bp和 3'端 189bp并含有 TGA终止码。

核苷酸序列的信号肽与基因库中眼镜蛇树属的 *Pseudonnaja textilis*^[2]、平颈海蛇 *Laticauda semifasciata*^[3] 100%同源;与眼镜蛇南洋亚种 *Naja sputatrix*^[4]、银环蛇 (*Bungarus multicinctus*)^[5] 96.8%同源。蛋白密码部分有 83.3%与 *Naja sputatrix* 同源,有 79.2%与 *Pseudonnaja textilis*、有 76.4%与 *Laticauda semifasciata*、有 74.1%与 *Bungarus multicinctus* 同源。详见图 4

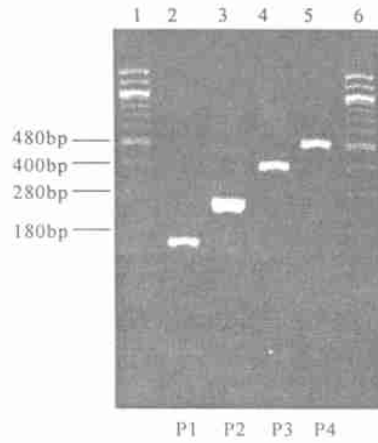


图 2 眼镜王蛇 (*Ophiophagus hannah*) α 神经毒素 cDNA PCR产物电泳分析

Fig. 2 Gel analysis of PCR products of Oh α -NT 1, 6(带: DNA 标志物; 2~ 5带: α 神经毒素 cDNA碎片 Lanes 1 and 6 DNA markers; Lanes 2 to 5 the cDNA fragments encoding sequence of Oh α -NT.

氨基酸顺序分析结果表明,信号肽后紧接着的 72 个氨基酸中有, 90.3%与已发现的眼镜王蛇蛇毒长链 α -NT Toxin a^[6]同源,大约有 73.6%与眼镜王蛇 α -NT Toxin b^[6]、69.7%与眼镜王蛇 α -NT Oh-4^[7]、66.7%与眼镜王蛇 α -NT Oh-5^[8]、56.9%与眼镜王蛇 α -NT Oh-6A和眼镜王蛇 α -NT 6B^[9]同源,并与 α 银环蛇毒素^[10] 54.2%同源。详见图 5

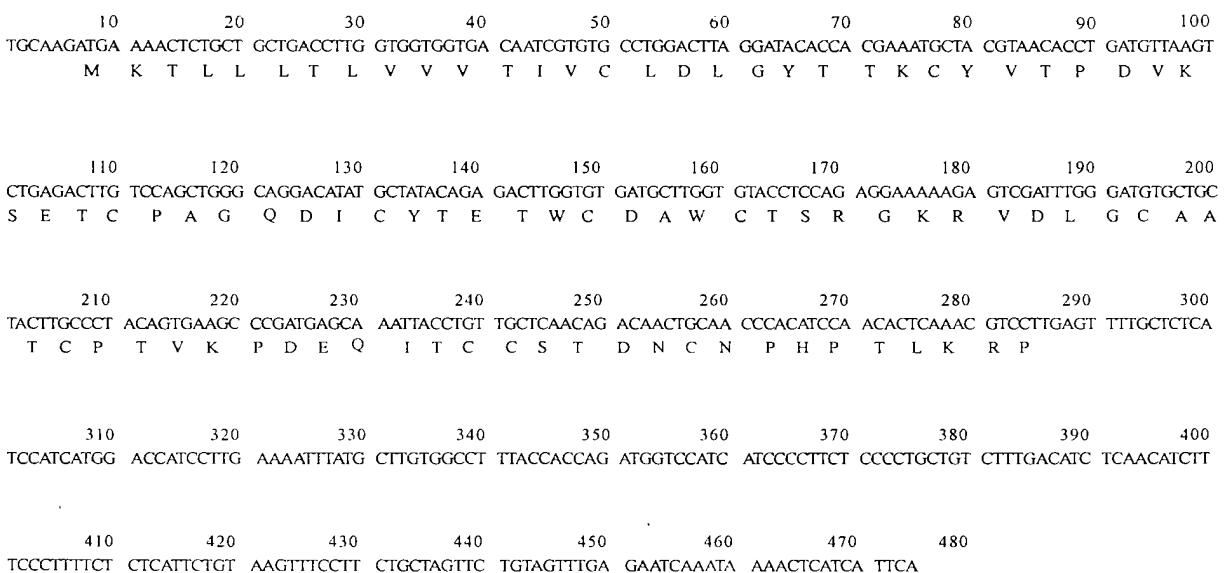


图 3 广西产眼镜王蛇 (*Ophiophagus hannah*) α 神经毒素 cDNA 核苷酸和扩增的蛋白质序列

Fig. 3 Nucleotide and deduced protein sequences of α -NT from Guangxi king cobra (*Ophiophagus hannah*)

Oh Toxin 5' -TGCAAGATG AAAACTCTGC TGCTGACCTT GGTGGTGGTG ACAATCGTGT GCCTGGACTT AGGATACACC
NsLNTX T CCGAAAAAGA TG-----C-----A-----
Pt PT-LNTX -----
Ls Ls III GAGAAGA TC-----
Bm α -NT GACTT TTGAGGCTC CCAGAGAAGA TC-----T-----

Oh Toxin ACGAAATGCT ACGTAAACACC TGATGTTAAG TCTGAGACTT GTCCAGCTGG GCAGGACATA TGCTATACAG AGACTTGGTG TGATGCTTGG TGTACCTCCA
NsLNTX -TA-G-----T-A-----CC--AC-GA--AA---T G--A-----G-TC---G-G--
Pt PT-LNTX -G-G-----T-A-----A--A-C---C---GG--C--A-----G--TT--GG-AT--
Ls Ls III -G-G-----C-G-AT--C---C A-C---T---A-A-----GT-A--T-----A-----G-AG--
Bm α -NT -TCGT---C--AC---G--C-T---GC G--T---C---G-A-C---G-A---TG-----A-TC---T-AG--

Oh Toxin GAGGAAAAAG AGTCGATTGG GGATGTGCTG CTACTTGCCG TACAGTGAAG CCCGATGAGC AAATTACCTG TTGCTCAACA GACAACTGCA ACCCACATCC
NsLNTX -----G-----G--T-G--T--CAA--T-----T-----TT--
Pt PT-LNTX -----GC-----TCCA---A--G-ATAG T--T---C---G-T---A--TT--
Ls Ls III -----GGT C---A-T-----A-----T-----C A--GAACCG-----AA---G---G---A--T---
Bm α -NT -----GGT-----A---G-----T-AA---T---G---G-----G-----

Oh Toxin AACACTCAAA CGTCCTGAG TTTGCTCTC ATCCATCATG GACCATCCTT GAAAATTTAT GCTTGTGGCC TTTACCACCA GATGGTCCAT CATCCCCTTC
NsLNTX -----T-----T-----C-----
Pt PT-LNTX -TT- -C---GGAG-----A-----A-----G-----G-
Ls Ls III GTA-C-G---T--G-----G-----T-----C-----A-----A-----C--
Bm α -NT G-A--AG-G- -C-GG-----T-----T-----T-----GAG-ATC--A-T---CTCAG

Oh Toxin TCCCTGCTG TCTTTGACAT CTCAACATCT TTCCTTTTC TCTCAITCTG TAAGTTTCT TCTGCTAGTT CTGTAGTTG AGAATCAAAT AAAACTCATC
NsLNTX -----T-----C---T-G-----TC-----TT-ATT-T
Pt PT-LNTX -----G-----
Ls Ls III -----A-----TG---T-----G-----G-
Bm α -NT -----T-----T-----T-----GAG-ATC--A-T---CTCAG

Oh Toxin ATTCA-3'
NsLNTX GAAGCGC
Ls Ls III ----
Bm α -NT CA TC CAA AAAAAAAAAA AAAAAA//

图4 眼镜蛇科 α 神经毒素相关 cDNA 序列的核苷酸排列比较

Fig. 4 Nucleotide sequence alignment of the correlation cDNA sequences of α -NT from Elapidae snakes

Oh: *Ophiophagus hannah*, Ns: *Naja sputatrix*, Pt: *Pseudonaja textiles*, Ls: *Laticauda emifasciata*, Bm: *Bungarus multicinctus*,
Mature protein coding region, signal peptide region.

cDNA
Oh α -NT MKLTLVVTIVCLDLGYTKCYVIPDV-KSE-TCAPAGQDICYTETWCDAWCTSRGKRVD-LGCAATCPTVKPDEQITCCSTDNCPNPHPLKRP (100%)
Venom
Oh Toxin a TKCYVIPDV-KSE-TCAPAGQDICYTETWCDAWCTSRGKRVD-LGCAATCPTVKPVEIKCCSTDNCPNPFTRKRP (90.3%)
Oh Toxin b TKCYVTPDA-TSC-TCPDGQDICYTKTWCDGFCSSRGKRVD-LGCAATCKIVKPGVEIKCCSTDNCPNPFTRKRP (73.6%)
Oh Oh-4 TKCYKTDRIISE-ACPPGQDKCYMKTWCDVFCGTRGKKVIEIGCAATCPTVKPHEQITCCSTDNCPNPHN-KMQ (69.4%)
Oh Oh-5 TKCYKTDRIISE-ACPPGQKLCYMKTWCDVFCGTRGKRVEIGCTATCPTVKPHEQITCCSTDNCPNPHN-KMRQ (66.7%)
Oh Oh-6A LICPISSHD-SV-TCAPGENVCLKSWCDAWCGSRGKLS-FGCAATCPKVNPGIDIECCSTDNCPNPH-KLRP (56.9%)
Oh Oh-6B LICPISSHD-SV-TCAPGENVCLKSWCDAWCGSRGKLS-FGCAATCPKVNPGIDIECCSTDNCPNPH-KLRP (56.9%)
Ns LNTX IRCFITPDV-TST-DCPNQ HVCYJTWCDFGSSRGRVE-LGCAATCPTVKPVDIQCSTDNCPNPFTRLRP (65.3%)
Nn Toxina IRCFITPDI-TSK-DCPNG HVCYKTKWCDGFCSSIRGKRVD-LGCAATCPTVKTGVDIQCSTDNCPNPFTRKRP (61.1%)
Bm α -bungarotoxin IVCHTTATSPISAVTCPGENLCYRKMWCDAFCSRRGKVV-LGCAATCPSKPYEEVTCSTDNCPNPHKQRP (54.2%)

图5 广西眼镜王蛇及其他蛇类蛇毒和 cDNA 的长链 α 神经毒素的氨基酸序列

Fig. 5 Amino acid sequence of long chain α -NT of the cDNA and venom from Guangxi king cobra and other snakes

Oh: *Ophiophagus hannah*, Ns: *Naja sputatrix*, Nr: *Naja naja* (India), Bm: *Bungarus multicinctus*, Signal peptide

3 讨论

逆转录 PCR (RT-PCR) 是目前获取基因较常用的方法。该方法通过提取细胞内 mRNA, 在逆转录病毒等条件下, 可以较忠诚的互补一条无内含子及调控等部分 DNA 基因信息 (cDNA), 接着进行 PCR 扩增使目的基因得到非生物性增大; 如果特异性较好, 即可直接进行测序进行基因分析。但是在实际工作中常发生少数区域模糊扩增现象而影响分析。为了克服这

些现象, 我们在取得 α -NT 氨基酸密码后在翻译蛋白区设计了一对上下游引物进行了特异性扩增 (P1) 同时利用这一特异引物与另一对非特异性引物进行组合 PCR 扩增 (P2 P3 和 P4), 结果得到了这一基因的 4 条不同长短的 PCR 产物, 测序后进行对比分析, 排除了模糊部分, 而得到较为忠实的眼镜王蛇 α -NT 基因信息。同时我们还对 3 条眼镜王蛇的蛇毒 α -NT 基因分别进行对比实验, 结果均为一致, 增加了其信息的可信性。

目前从蛇毒中分离出来的 α -NT根据分子量大小和二硫键的数目分为短链和长链2个类型,短链 α -NT由60~62个氨基酸残基组成,含4对链内二硫键;长链 α -NT由66~74个氨基酸残基组成含5对链内二硫键。它们都属碱性蛋白,立体空间构象呈三指环状。结构上的差异是长链 α -NT中央大环顶部分叉,这是第5对二硫键的存在所致,另一处是它有一个长的尾巴从致密的二硫键核心伸出^[1]。本实验所获得的基因核苷酸顺序经翻译蛋白质氨基酸顺序后,与已发现的蛇毒 α -NT进行对比分析,发现有较高的同源性,与实验预想一致。富含碱性氨基酸,同时所含的10个半胱氨酸与已发现的眼镜王蛇毒 α -NT的排列位置一致,即可组成5对二硫键。由于其氨基酸数目为73个,可以推断本实验所发现的基因信息为长链 α -NT。

本次试验发现的 α -NT基因未能与其它6种已发现的蛋白质氨基酸顺序相符,最高同源性只是与Toxin a有90.3%的相符。从而推想,眼镜王蛇 α -NT毒素还有大量存在而未被发现的基因信息。本次发现的 α -NT基因未被列在目前已知氨基酸序列的6种 α -NT之中,可能是其它6种未知序列的其中一种,或者是另一种 α -NT尚未被发现。

参考文献

1 李其斌.蛇毒 α 神经毒素及其基因研究进展.蛇志,2001,13(3):61~65.

2 <http://crick.genes.nig.ac.jp/homology/fasta.shtml>. DDBJ/EMBL/GenBank databases, AF082982, 1999.

3 <http://crick.genes.nig.ac.jp/homology/fasta.shtml>. DDBJ/EMBL/GenBank databases, AF015513, 1998.

4 <http://crick.genes.nig.ac.jp/homology/fasta.shtml>. DDBJ/EMBL/GenBank databases, AF026893, 1997.

5 <http://crick.genes.nig.ac.jp/homology/fasta.shtml>. DDBJ/EMBL/GenBank databases, AF056416, 1998.

6 Joubert F J. The amino acid sequences of two toxins from *Ophiophagus hannah* (King cobra) venom. *Biochim Biophys Acta*, 1973, 317: 85~98.

7 Chang C C, Huang T Y, Kuo K W et al. Sequence characterization of a novel α -neurotoxin from the King cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 191: 214~223.

8 Lin S R, Leu L F, Chang L S et al. Amino acid sequence and chemical modification of a novel α -neurotoxin (Oh-5) from King cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. *J Biochem*, 1997, 121: 690~695.

9 Lin S R, Chang L S, Chang C C. Disulfide isomers of α -neurotoxins from King cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 254: 104~108.

10 M Ohta, K Ohta, H Nishitani et al. Primary structure of α -bungarotoxin. *FEBS Letters*, 1987, 222: 79~82.

(责任编辑:邓大玉)

(上接第20页 Continue from page 201)

11 Lax P D, Wendroff B. Systems of conservation laws. *Pure Appl Math*, 1960, 13: 217~237.

12 Abbott M B. Continuous flows discontinuous flows and numerical analysis. *J Hydraul Res*, 1974, 12(4): 417~467.

13 Karambas Th, Krestenitis Y, Koutitas C. A numerical solution of Boussinesq equations in the inshore zone. *Hydrosoft*, 1990, 3(1): 34~37.

14 Karambas Th, Koutitas C. A breaking wave propagation model based on the Boussinesq equations. *Coastal Eng*, 1992, 18: 1~19.

15 Goda Y. A synthesis of breaker indices. *Trans of JSCE*, 1970, 2(2): 227~229.

16 Madsen P A, Rensen O R, Schäffer H A. Surf zone dynamics simulated by a Boussinesq type model (Part I): model description and cross-shore motion of regular

waves. *Coastal Eng*, 1997, 32: 255~287.

17 Larsen J, Dancy H. Open boundaries in short wave simulations—a new approach. *Coastal Eng*, 1983, 7(3): 285~297.

18 李玉成,董国海,滕斌.浅水区波浪的破碎指标.水动力学研究与进展,1991,6A(2):99~109.

19 陈妙福,赵耀南,王常生.倾斜底坡上波浪的传播与破碎.水动力学研究与进展,1992,7A(2):192~198.

20 苏铭德.有限和无限深定常水波最高波高度及其流场的计算.水动力学研究与进展,1984,2:31~46.

21 Longuet-Higgins M S, Fox M J H. Theory of the Almost-highest wave the inner solution. *Jour of Fluid Mechanics*, 1977, 80: 721~741.

(责任编辑:邓大玉)