

东亚钳蝎神经毒素基因 Bm KCT 的克隆与表达^{*}

张守涛^{1,2}, 郭霁光², 肖乐义¹, 董建军¹,
赵天增¹, 薛歧庚¹, 孔天翰³, 郭 唯¹

(1 河南省科学院 生物技术开发中心, 河南 郑州 450002; 2 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨陵 712100;

3 郑州大学 医学院, 河南 郑州 450002)

[摘 要] 从蝎毒腺中提取总 RNA, 通过 RT-PCR 得到东亚钳蝎神经毒素 Bm KCT 的 cDNA, 将其连接到 pUCm-T 载体中。序列分析表明, 该基因开放阅读框架编码 59 个氨基酸残基, 其中 24 个为信号肽, 其余 35 个为成熟肽, 与 Genbank 上登录的相同。将蝎神经毒素 cDNA 再经 PCR 扩增除去信号肽序列, 克隆到 pTrcHisA 表达载体中, 转化大肠杆菌 BL 21(DE3), 经 IPTG 诱导可高效表达分子质量为 10 ku 左右的融合蛋白。表达产物约占菌体总蛋白的 25%。

[关键词] 蝎毒素; cDNA; 融合表达

[中图分类号] Q 784

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2002)06-0030-04

全蝎作为动物源性中药, 具有抗肿瘤、镇痛、抗惊厥、抗癫痫、抗凝血、增强免疫功能、消炎^[1~4]等医疗作用, 已在临床上应用上千年。蝎毒为蝎尾毒囊中排出的一种有毒分泌物, 是全蝎治疗疾病的有效成分, 其大部分是具有药理学活性的蛋白质。作为研究蛋白质结构和功能关系的极好模型和神经药理学研究的理想工具, 蝎毒素已受到国内外学者的广泛关注^[5,6]。由于蝎毒素成分复杂, 从新鲜蝎毒中制备和纯化天然神经毒素很困难, 同时, 各成分分子质量比较接近, 纯化难度较大, 有一定的毒副作用, 临床应用受到一定限制。随着生物技术的发展, 将具有药理活性、昆虫毒性的毒素蛋白 cDNA 或基因引入细胞或动植物体内, 以利于中药的合理开发和利用, 这是中药现代化的需要^[7]。

本试验克隆表达的 Bm KCT 是东亚钳蝎短链蝎神经毒素, 与从 *Leiurus quinguestriatus* 中分离的 chlorotoxin 有 68% 的同源性^[8], 根据其结构推测可能是小电导的 Cl⁻ 通道阻断剂。蝎毒素 Cl⁻ 通道阻断剂的代表 chlorotoxin 对脑神经胶质瘤细胞迁移、扩散和增殖具有显著的抑制作用^[9~11]。本研究扩增至 Bm KCT 成熟肽基因片段, 使其克隆在 Lac 启动子的下游, 在大肠杆菌中获得了高效表达。

1 材料与方法

1.1 材 料

东亚钳蝎 (*Buthus martensii* Karsch) 购自河南

个体养殖户, 宿主菌 JM 109, pUCm-T 质粒购自上海生工生物工程有限公司; pTrcHisA 质粒、宿主菌 BL 21(DE3) 由西北农林科技大学崔晓峰惠赠; 逆转录酶、Taq 酶、T4 DNA 连接酶、蛋白标准分子质量 Marker 和 DNA Marker 均为 Promega 公司产品; 限制性内切酶为 MBI 公司产品; 所用引物皆由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 方 法

1.2.1 引物设计 对已发表的东亚钳蝎毒素 cDNA 序列进行分析, 发现在 5' 端起始密码子附近区域和 3' 端非编码区高度保守, 据此设计 3 条特征性引物: 引物 1 为 5'-gcgcggaattcaaatga; 引物 2 为 5'-gcgcggaattcaagatg; 引物 3 为 5'-gcgcggaattctttttttttttt。

引物 1 和 2 设计在起始密码子位点, 引物 3 为蝎毒素基因 3' 端非编码区互补序列。分别以引物 1 和 2 作为上游引物, 引物 3 为下游引物组成 2 对引物。

1.2.2 总 RNA 的提取 蝎子电刺激排毒后, 分别于 2, 4, 8, 12, 24, 48 h 切下毒腺, 加液氮研磨成粉末, 加入异硫氰酸胍, 按分子克隆上的异硫氰酸胍热酚法提取总 RNA^[12], 总 RNA 质量和浓度通过甲醛变性电泳检测。

1.2.3 RT-PCR 和重组克隆 加 DEPC 水到总体积 15 μ L, 70 $^{\circ}$ C, 5 min 破坏 RNA 模板中的二级结构, 迅速置于冰上, 加 5 $\times$ RT 缓冲液, 0.5 mmol/L

^{*} [收稿日期] 2002-06-17

[基金项目] 河南省重点科技攻关项目 (0223032300)

[作者简介] 张守涛 (1972-), 男, 河南开封人, 在职研究生, 主要从事分子生物学研究。

的 dNTP, 20 $\mu\text{mol/L}$ RNA 酶抑制剂和 200 $\mu\text{mol/L}$ M-MLV 反转录酶, 再加水至总体积 25 μL , 42 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h, 94 $^{\circ}\text{C}$, 10 min 灭活逆转录酶。

以电刺激后不同时间提取 RNA 合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$, 1 min; 94 $^{\circ}\text{C}$, 40 s; 58 $^{\circ}\text{C}$, 50 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 60 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 5 min, 共进行 38 个循环。PCR 产物于 2% 的琼脂糖凝胶电泳分析。对电泳条带针刺粘取后二次扩增, 分为单条带。二次扩增产物和 pUCm-T 载体连接后转化大肠杆菌 JM 109。挑取单菌落, 抽提质粒, PCR 及酶切鉴定。送到大连宝生物公司测序。

1.2.4 诱导表达蝎毒素基因 提取重组 pUCBm KCT 质粒, 根据测序结果设计新的引物扩增其成熟肽部分。

引物 4: 5'-gcgcggatcctgtgggccttgctttacaacggat;

引物 5: 5'-gcgcgaattctcatatacggttacacagacattg。

在引物 4 和 5 中分别引入 *EcoR* I 和 *Bam* H I 位点, 扩增成熟肽基因(扩增反应条件同上), 酶切后克隆到 pTrcHisA 载体中。将重组质粒

pTrcBm KCT 转化 BL 21(DE3), 37 $^{\circ}\text{C}$, 240 r/min 培养过夜, 取该培养物 1 mL 加到 50 mL LB 培养基中(含 90 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素), 37 $^{\circ}\text{C}$, 280 r/min 培养 2 h, 加入 IPTG 诱导表达, 继续培养, 分别于 1, 2, 3, 4 h 取 1 mL, 离心收获菌体进行 SDS-PAGE 电泳检测。

2 结果与讨论

2.1 RT-PCR 法获得 Bm KCT 基因

用异硫氰酸胍热酚法提取总 RNA, 经电泳检查后看到 28 S 和 18 S 两条 rRNA 带, 说明总 RNA 无明显降解。引物 1 和 2 分别作为上游引物与下游引物的引物 3 组合, 以逆转录产物为模板合成 cDNA, 共得到 30 多个条带。由于在 Genebank 登录的蝎毒素分子质量都较小, 故选取 100~600 bp 的 24 个条带(图 1, 横线上方的), 对这些条带针刺粘取后进行二次扩增, 分成单条带。

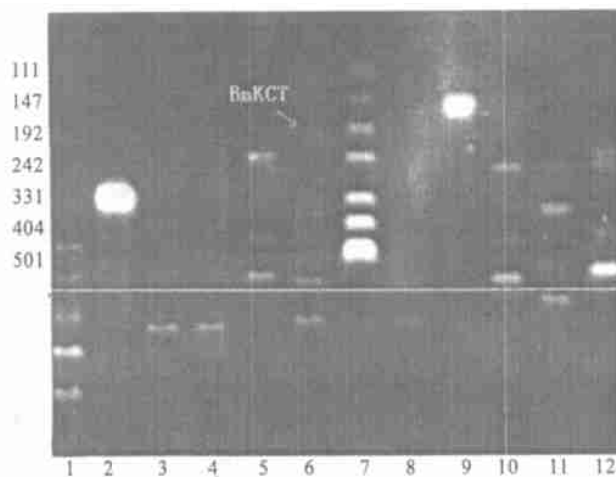


图 1 RT-PCR 产物经 2% 琼脂糖电泳分析结果

泳道 1~6, 8~12 为 RT-PCR 产物; 泳道 7 为

Marker pUC19 DNA / *Msp* I (*Hpa* I)

Fig 1 Amplifying cDNA with PCR

1- 6, 8- 12 PCR products;

7. Marker pUC19 DNA / *Msp* I (*Hpa* I)

2.2 蝎毒素 cDNA 克隆和序列分析

二次 PCR 产物和 pUCm-T 质粒连接, 连接产物转化大肠杆菌 JM 109。挑取白色菌落于 LB 培养基中培养, 经 PCR 和酶切鉴定, 获得数个阳性克隆, 随机挑取 8 个进行序列分析, 其中 1 个(见图 1)与已发表的蝎毒素 Bm KCT (genebank 登录号为

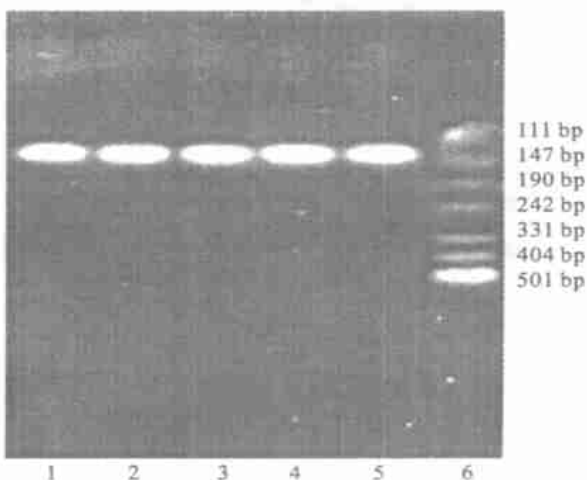


图 3 Bm KCT 成熟肽基因扩增结果

泳道 1~5 为 PCR 得到的 Bm KCT 成熟

肽基因; 泳道 6 为 Marker

Fig 3 PCR amplifying of the gene

codin Bm KCT mature peptide

1- 5 PCR products; 6 Marker

pUC19 DNA / *Msp* I (*Hpa* I)

A F135821) 完全一致, 其序列及其推导的氨基酸序列如图 2 所示。该基因共 180 bp, 编码 59 个氨基酸残基, 包含 24 个氨基酸的信号肽和 35 个氨基酸的成熟肽, 共有 4 个二硫键, 与从 *Leiurus quinquestriatus* 中分离的 cholo toxin 有 68% 的同源性^[8]。

```

1   M K F L Y G I V F I A L F L T V M F A T
1   atgaagttcctctacggaatcgttttcattgcacttttctaactgtaatgttcgcaact
21  Q T D G C G P C F T T D A N M A R K C R
61  caaactgatggatgtgggccttgctttacaacggatgctaataaggcaaggaaatgtagg
41  E C C G G I G K C F G P Q C L C N R I stop
121 gaatgttgcggagggtattggaaaatgcttggcccacaatgtctgtgtaaccgtatatga

```

图 2 蝎毒素 Bm KCT 基因的序列分析

Fig 2 Sequences of Bm KCT

2.3 Bm KCT 基因在大肠杆菌中的表达

重组 pUCBm KCT 用引物 4 和 5 扩增 Bm KCT 成熟肽基因(图 3), 扩增产物用 *EcoR* I, *Bam* H I 双酶切, 纯化后连接到表达载体 pTrcHisA 上, 构建 lac 启动子下含有 Bm KCT 成熟肽基因的高效表达载体 pTrcBm KCT (图 4), 并转化大肠杆菌 BL 21, 挑取单菌落, 提取重组质粒进行 PCR 和 *EcoR* I, *Bam* H I 双酶切鉴定, 双酶切电泳图在 120 bp 左右的位置有 1 条带, 和 Bm KCT 成熟肽基因大小一致(图 5)。以 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达后, 按文献[12]的方法进行样品处理和 SDS-PAGE, 脱色后重组质粒泳道有 1 条分子质量约为 10 ku 的表达条带, 与理论推算的基本一致, 而非重组质粒比重组质粒多了 1 条 5 ku 左右的条带(图 6), 所以可以推断前一条带即为带有融合部分的表达蛋白, 而后一条则是 pTrcHisA 原质粒基因的表达产物。表达产物在诱导后 1 h 开始表达, 在 4 h 时表达量最大, 表达产物占总蛋白的 25% 左右。

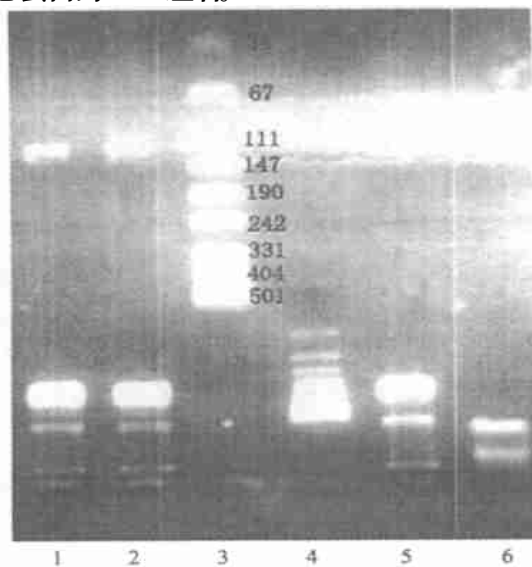


图 5 重组 pTrcBm KCT 双酶切分析

泳道 1, 2, 5 为双酶切重组 pTrcBm KCT;
泳道 3, 4 为 Marker; 泳道 6 为未酶切重组 pTrcBm KCT
Fig 5 Identification of the recombinant plasmid
by *EcoR* I/*Bam* H I digestion (2.0% agarose gel)
1, 2, 5 pTrcBm KCT/*EcoR* I/*Bam* H I; 3, 4 Marker;
6 Recombinant without restriction cleavage

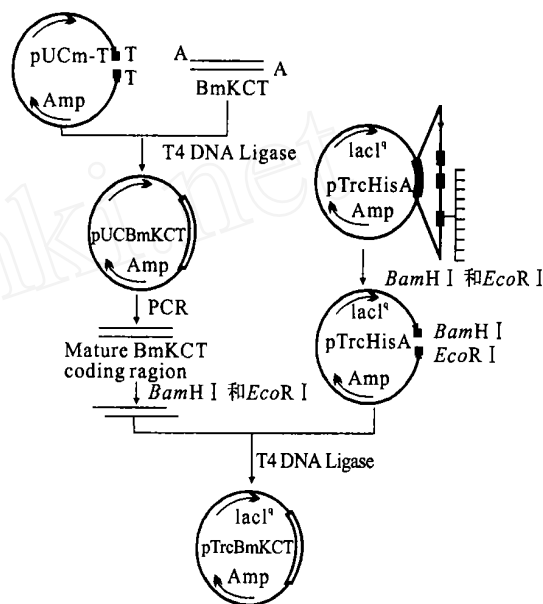


图 4 重组表达载体 pTrcBm KCT 构建

Fig 4 Construction of the recombinant plasmid pTrcBm KCT

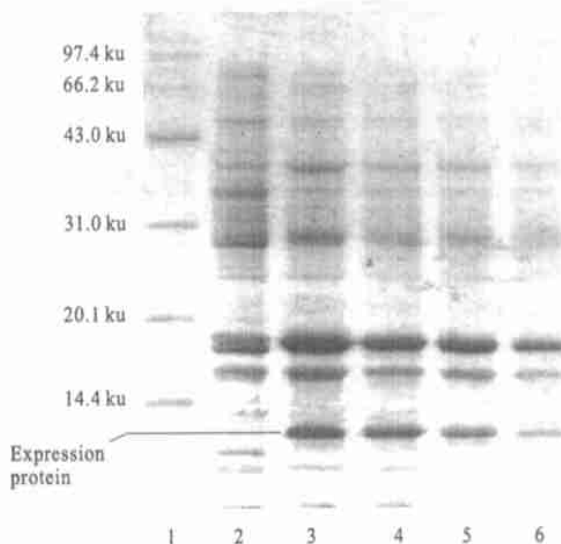


图 6 重组质粒 pTrcBm KCT 的 15% SDS-PAGE 分析

1. 蛋白分子质量 maker (94, 67, 43, 30, 20, 14.5 ku);
2 未诱导; 3~6 诱导时间分别为 4, 3, 2 和 1 h
Fig 6 SDS-PAGE analysis of the fusion
protein expression in *E. coli*
1. Molecule mass standards; 2 pTrcHisA;
3- 6 Induction with 1 mmol/L IPTG for 4, 3, 2 and 1 h

Cholotoxin 是小电导的 Cl^- 通道阻滞剂, 对脑神经胶质瘤细胞迁移、扩散和增殖具有显著的抑制作用^[9~11]; 又由于全蝎和已纯化的很多蝎毒素多肽都具有医疗作用, 所以初步推测该Bm KCT 编码的

多肽也具有潜在的生理活性和药用价值。关于该表达产物的进一步分离纯化、活性和药理试验正在进行之中。

[参考文献]

- [1] 杜钢军, 徐颖, 牟孝硕, 等. 蝎毒多肽的镇痛及抗炎作用[J]. 沈阳药科大学学报, 1998, 15(2): 106-108
- [2] 刘敏芝, 宋洪臣, 黄民, 等. 东亚钳蝎毒素的镇痛作用与吗啡镇痛作用比较[J]. 白求恩医科大学学报, 1995, 21(3): 260-262
- [3] 何均珑, 徐晓也, 任雅明. 蝎毒对大白鼠血浆中血栓烷 B_2 , 6-酮-前列腺素 $\text{F}_{1\alpha}$ 的影响[J]. 苏州医学院学报, 1995, 15(1): 35-36
- [4] 杨建斌, 李晓雯, 董伟华. 东亚钳蝎毒抗癌多肽对 H_{22} 荷瘤小鼠的免疫调节作用[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(12): 736-739
- [5] Becerril B, Marangoni S, Possani L D. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus Tityus[J]. Toxicon, 1997, 35(6): 821-835
- [6] Becerril B, Corona M, Garcia C, et al Cloning of genes encoding scorpion toxins: an interpretative review[J]. Toxicon, 1995, 14(3): 339-357
- [7] 肖乐义, 薛歧庚, 董建军, 等. 开展中药基因组计划的研究[J]. 中草药, 2001, 32(1): 1-3
- [8] Zeng X C, Li W X, Zhu S Y, et al Cloning and characterization of a cDNA sequence encoding the precursor of a chlorotoxin-like peptide from the Chinese scorpion *Buthus martsenii* Karsch[J]. Toxicon, 2000, 38(8): 1009-1014
- [9] Sorocceanu L, Manning T J, Sontheimer H. Modulation of glioma cell migration and invasion using Cl^- and K^+ ion channel blockers[J]. J Neurosci, 1999, 19(14): 5942-5954
- [10] Sorocceanu L, Gillespie Y, Khazaeli M B, et al Use of chlorotoxin for targeting of primary brain tumors[J]. Cancer Res, 1998, 58(21): 4871-4879
- [11] Rich N, Bordey A, Gillespie G Y, et al Expression of voltage-activated chloride currents in acute slices of human gliomas[J]. Neuroscience, 1998, 83(4): 1161-1173
- [12] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

Cloning and expression of a neurotoxin from chinese scorpion

Buthus martsenii Karsch in *Escherichia coli*

ZHANG Shou-tao^{1,2}, GUO Ai-guang², XIAO Le-yi¹, DONG Jian-jun¹,

ZHAO Tian-zeng¹, XUE Qi-geng¹, KONG Tian-han³, GUO Wei¹

(1 Biotechnology Developing Center of Henan Academy of Sciences, Zhengzhou, Henan 450002, China;

2 College of Life Science, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forest, Yangling, Shaanxi 712100, China;

3 College of Medical, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450002, China)

Abstract: A neurotoxin cDNA was cloned from Chinese scorpion *Buthus martsenii* Karsch by RT-PCR. The cDNA was cloned into the pUCm-T vector and sequenced. It has a ORF encoding 59 amino acid residues and a 24 residues signal peptide. The cDNA encoding the mature peptide was amplified by PCR and was cloned into pTrcHisA vector. The recombinant vector was transformed into *E. coli* BL 21 (DE3). The *E. coli* highly expressed the fusion protein whose molecular weight is 10 ku, after induced by 0.1 mol/L IPTG. The expressed protein was accumulated up to more than 25% of total bacterial protein.

Key words: scorpion toxin; cDNA; fusion expression